

Institut für Veterinärphysiologie
der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich
Direktor: Prof. Prof. h.c. Dr. med. vet. Max Gassmann

Arbeit unter wissenschaftlicher Betreuung von:
Privatdozentin Dr. rer. nat. Stilla Frede

**Einfluss von Erythrozytenkonzentraten unterschiedlichen Alters auf
die Leberregeneration nach partieller Hepatektomie**

Inaugural-Dissertation

Zur Erlangung der Doktorwürde der
Vetsuisse-Fakultät, Universität Zürich

vorgelegt von

Katrin Stein

Tierärztin aus Bonn, Deutschland

Genehmigt auf Antrag von

Prof. Prof. h.c. Dr. med. vet. Max Gassmann

Privatdozentin Dr. rer. nat. Stilla Frede

2020

Für meine wunderbaren Eltern

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	8
Summary	9
1. Einleitung	10
1.1. Storage lesions	11
1.2. Leberregeneration	18
1.3. Einfluss von Bluttransfusionen auf die Leberregeneration	20
1.4. Hypoxie induzierbare Faktoren (HIFs).....	21
1.5. HIF Zielgene	24
1.5.1. Aldolase	24
1.5.2. Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (VEGF)	24
1.5.3. Erythropoietin (EPO)	25
1.5.4. Angiopoietin 2 (ANG-2)	26
1.5.5. Glukosetransporter 1 (GLUT-1).....	26
1.6. Für die Fragestellung relevante Zytokine	27
1.6.1. Interleukin 1 β (IL-1 β)	27
1.6.2. Interzelluläres-Adhäsions-Molekül-1 (ICAM-1)	28
1.6.3. Interleukin-8 (IL-8).....	28
1.6.4. C-reaktives Protein (CRP).....	29
1.7. Fragestellung der Arbeit	29
2. Material und Methoden	31
2.1. Zellkulturen	31
2.1.1 HepG2 Zellen.....	31
2.1.2 THP-1 Zellen	32
2.1.3 HPME Zellen (HPMEC)	33
2.2. Aufarbeitung der Erythrozytenkonzentrate (EK)	34
2.3. Quantitativer Nachweis von freiem Hämoglobin.....	35

2.4.	Proliferations- und Vitalitätstest	35
2.5.	Genexpressionsnachweis	36
2.6.	RNA Isolation aus Zellen	37
2.6.1.	RNA Isolation aus Rattenlebern	39
2.6.2.	cDNA Synthese	40
2.6.3.	Real Time PCR (q-PCR).....	41
2.7.	Protein Nachweis.....	45
2.7.1.	Zelllyse.....	45
2.7.2.	Western Blot.....	46
2.7.3.	Enzym-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA).....	47
2.7.4.	Proteome Profiler™	48
2.8.	Statistische Methoden	49
3.	Resultate.....	50
3.1.	<i>In-vivo</i> Modell.....	50
3.1.1.	Einfluss von PHx, Blutverlust und Transfusion mit frischen oder alten EKs auf die Proliferation von Hepatozyten.....	50
3.1.2.	Einfluss von PHx, Blutverlust und Transfusion mit frischen oder alten EKs auf die Oxygenierung des Lebergewebes	53
3.1.2.	Einfluss von PHx, Blutverlust und Transfusion von fEK, aEK und HAES auf Makrophagen	61
3.2.	Humanes <i>in-vitro</i> Modell.....	64
3.2.1.	Altersabhängige Veränderungen von EKs	64
3.2.2.	Veränderung der Zellvitalität von HepG2 Zellen in Abhängigkeit vom Alter der Erythrozytenkonzentrate	66
3.2.3.	Veränderung der Expression verschiedener Gene durch den Einfluss von EKÜs unterschiedlichen Alters im humanen <i>in-vitro</i> Modell	68
3.2.4.	Semiquantitativer HIF-1 α Nachweis in HepG2 Zellen nach Inkubation mit frischen oder alten EKÜs mittels Western Blot.....	85
3.2.5.	Quantitativer Nachweis der HIF-1 α Menge in HepG2 Zellen nach Inkubation mit frischen oder alten EKÜs mittels ELISA	87

3.2.6. Detektion des Zytokin Gehaltes von Überständen frischer bzw. gealterten EKs.....	90
4. Diskussion.....	93
4.1. <i>In-vivo</i> Modell.....	93
4.2. Humanes <i>in-vitro</i> Modell.....	96
5. Literaturverzeichnis	101
6. Abbildungsverzeichnis	117
7. Abkürzungsverzeichnis	119
8. Anhang	123
8.1. Abbildungen.....	123
8.2. Tabellen	125
Danksagung	128
Curriculum Vitae.....	129

Zusammenfassung

Erythrozytenkonzentrate (EKs) werden routinemäßig zum Ausgleich des intraoperativen (i.o.) Blutverlustes während einer partiellen Hepatektomie genutzt. Während der maximalen Lagerdauer von 42 Tagen unterliegen diese EKs metabolischen, biochemischen und morphologischen Veränderungen, den „*storage lesions*“. Wir konnten in einem *in-vivo* Tiermodell zeigen, dass der i.o. Blutverlust während einer partiellen Hepatektomie die Regeneration der Leber verzögert und dass eine Transfusion von gelagerten EKs diesen Effekt verstärkt.

In einem humanen *in-vitro* Modell zeigte sich, dass Überstand von 42 Tage gelagerten EKs die Vitalität von Hepatozyten sowie deren Anpassungsfähigkeit an hypoxische Bedingungen hemmt. Eine Inkubation von Endothelzellen mit EK Überständen führte zu einer erhöhten Expression proinflammatorischer Gene. In den EK Überständen selber zeigte sich teilweise eine Veränderung im Gehalt verschiedener proinflammatorischer Marker über die Lagerungsdauer. Dies könnte einen wichtigen klinischen Einfluss haben, z.B. auf die Inzidenzerhöhung einer Transfusion-Related-Lung-Injury (TRALI). Aufgrund wiederholt auftretender Heterogenität bestimmter Ergebnisse gehen wir von erheblichen Spender-spezifischen Veränderungen der EKs aus.

Keywords: Storage lesions·Leberregeneration·Hypoxie Adaptation

Summary

Human red blood cells (RBCs) are frequently used to compensate the intraoperative bloodloss during a partial hepatectomy. These RBCs can be stored for up to 42 days, during this time they undergo metabolic, biochemical and structural changes, so called storage-lesions. In an in-vivo rat model we could show that intraoperative blood loss during a partial hepatectomy impaired liver regeneration and substitution of old RBCs increased this effect. In human in-vitro experiments supernatant of 42 days stored RBCs decreased the viability as well as the adaptation to hypoxic conditions of HepG2 cells. In endothelial cells incubation with RBC lead to an elevation of the expression of certain proinflammatory genes and the content of proinflammatory markers in the RBC supernatant partly changed storage time dependent. This phenomenon could have clinical influences such as the increase in incidence of Transfusion-Related-Lung-Injury (TRALI). Due to repeated heterogeneous results in the in-vitro experiments we suppose donor-specific influence on the aging process of RBCs.

Keywords: storage lesions·liver regeneration·hypoxia-adaptation

1. Einleitung

Die orthotopische Lebertransplantation ist heutzutage ein weltweit gängiges chirurgisches Verfahren, dass bei chronischem und akutem Leberversagen, bedingt durch verschiedenste Leberkrankheiten oder -traumata, Anwendung findet (Solves et al. 2014). Alleine Eurotransplant verzeichnet jährlich rund 1500 Lebertransplantationen und knapp 100 Teilleber- Lebendspenden (Eurotransplant, annual Report, 2015).

Neben der Lebertransplantation ist die partielle Hepatektomie (PHx) einer der meist durchgeführten chirurgischen Eingriffe im Fachbereich der Hepatologie. Häufige Indikationen hierfür sind Leberschädigungen durch Infektionen, maligne sowie benigne Tumore, Traumata oder Leberabszesse (Grundmann und Pichlmaier, 1983).

Da sowohl der Eingriff der PHx als auch der Lebertransplantation in den meisten Fällen mit einem massivem Blutverlust einhergehen, ist eine intraoperative Bluttransfusion für viele Patienten unumgänglich. Obwohl es das Ziel ist, durch Modifikation des operativen Eingriffs und des anästhesiologischen Managements eine Operation ohne Bluttransfusion zu erreichen, so ist dies lange nicht in allen Fällen möglich (Clevenger und Mallett, 2014). Jarnagin und Kollegen untersuchten 2002 in einer retrospektiven Studie das Ergebnis von 1803 Teilhepatektomie Operationen. Hier war der durchschnittliche Blutverlust so hoch, dass knapp jeder zweite (48%) der einbegriffenen Patienten eine Bluttransfusion von im Schnitt 4 Einheiten benötigte (Jarnagin et al., 2002). Da jede Einheit aus ca. 300ml besteht, ergibt sich ein durchschnittliches transfundiertes Gesamtvolumen von 1200ml, was ca. 20% des gesamten Blutvolumens eines Erwachsenen entspricht.

Die für die Transfusion eingesetzten Erythrozytenkonzentrate (EKs) werden üblicherweise bis zu 42 Tage bei einer Temperatur zwischen 2-6°C gelagert. Während dieser Lagerzeit kommt es allerdings zu biochemischen, metabolischen und strukturellen Veränderungen der Zellen und deren Überstand (bestehend aus Residualplasma, Residualleukozyten und Konservierungsmedium). Diese unter dem Begriff „*storage lesions*“ zusammengefassten Veränderungen beeinflussen Funktionen und Eigenschaften der EKs (Qu und Triulzi 2015).

1.1. Storage lesions

Die kernlosen Erythrozyten werden in hämatopoetischem Gewebe aus pluripotenten Stammzellen in mehreren Entwicklungsschritten gebildet, durchlaufen 100-120 Tage den Körper und werden dann hauptsächlich in der Milz phagozytotisch abgebaut (Lang et al., 2005 S.420-423). Der physiologische Abbau von Erythrozyten findet extrazellulär im Knochenmark sowie in der Milz und der Leber statt, wobei verschiedene Abbauprodukte entstehen. Die frei werdende Häm-Gruppe wird in Protoporphyrin und Eisen gespalten. Das Protoporphyrin wird zu Bilirubin umgewandelt, welches in der Leber konjugiert wird und über die Gallenflüssigkeit in den Darm gelangt. Dort wird es größtenteils als Sterkobilinogen ausgeschieden. Nur ein kleiner Teil wird rückresorbiert und renal eliminiert (Hoffbrand et al., 2003, S.55; Kiefel und Mueller-Eckhardt, 2010, S.25). Das aus der Häm Gruppe stammende Eisen wird, gebunden an das im Plasma enthaltene Protein Transferrin, zurück ins Knochenmark zu Vorläuferzellen der Erythrozyten transportiert. Beim Erythrozytenabbau frei werdendes Globin wird in seine einzelnen Aminosäuren aufgeschlüsselt, welche dann zum erneuten Proteinaufbau wiederverwendet werden (Hoffbrand et al., 2003, S.55-56).

Hauptaufgabe der Erythrozyten ist der Transport von Sauerstoff (O_2) zum und der Abtransport von Kohlenstoffdioxid (CO_2) vom Gewebe (van de Watering und Brand, 2008). Für den Transport des Sauerstoffes ist das in den Erythrozyten enthaltene Protein Hämoglobin (Hb) zuständig, welches aus 4 Untereinheiten besteht, die sich jeweils aus einer Häm-Gruppe und einer Polypeptid-Gruppe zusammensetzen. Das in der Häm-Gruppe enthaltene zweiwertige Eisen (Fe^{2+}) bindet O_2 , wobei die Affinität dieser Bindung von mehreren Faktoren abhängig ist. Diese sind unter anderem der pH-Wert, die Temperatur und der Gehalt an 2,3-Diphosphoglycerat (2,3-DPG) (Ganong und Auerswald, 1979).

Durch die sigmoidal verlaufende Sauerstoff-Hämoglobin-Bindungskurve wird das Verhältnis vom Sauerstoffpartialdruck (PO_2) zur Sauerstoffsättigung des Hämoglobins dargestellt (Oczenski et al., 2012 S.123-126). Im Bereich geringer PO_2 Werte verläuft die Kurve sehr steil, kleine Veränderungen des PO_2 haben hier große Änderungen der Sauerstoffsättigung des Hbs zur Folge. Im Bereich hoher PO_2 Werte verläuft die Kurve dagegen sehr flach, Änderungen des

Sauerstoffpartialdruckes bewirken hier also nur geringe Änderungen der Hb Sättigung. Kommt es zu Änderungen der O_2 -Affinität, verschiebt sich die Kurve nach rechts, Hämoglobin bindet bei niedrigerem PO_2 weniger O_2 , oder nach links, Hämoglobin bindet mehr O_2 bei gleichem PO_2 und es wird weniger O_2 an das Gewebe abgegeben. Der Effekt der Linksverschiebung wird unter anderem durch einen erniedrigten 2,3-DPG Wert hervorgerufen (Abb.1.1.) (Kretz und Teufel, 2006 S.81-82). Mehrere Studien zeigten, dass der 2,3-DPG Gehalt in gelagerten Erythrozyten innerhalb der ersten Tage signifikant absinkt, wodurch es zu einer erhöhten O_2 -Affinität des Hämoglobins und damit zu einer verschlechterten Abgabe von O_2 an das Gewebe kommt (Bennett-Guerrero et al., 2007).

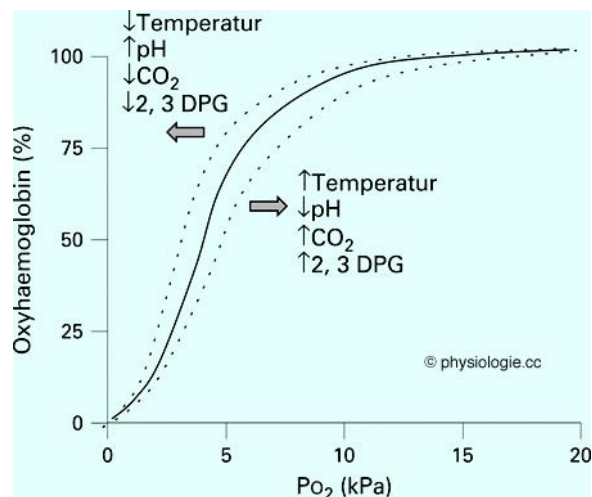


Abb. 1.1 Einflüsse auf die Sauerstoff-Hämoglobin-Bindungskurve

Einfluss von Temperatur, pH-Wert, CO_2 - sowie 2,3-DPG-Gehalt auf die Sauerstoffsättigung.

aus: <http://physiologie.cc/VII.4.htm>

Bei Temperaturen zwischen 2° und 6°C, wie sie unter Lagerungsbedingungen herrschen, kann die Natrium (Na^+) / Kalium (K^+) Pumpe in der Zellmembran nicht mehr arbeiten. Dies hat zur Folge, dass Na^+ in die Zelle hinein und K^+ heraus strömt (van de Watering und Brand, 2008). Bennett-Guerrero et al. konnten 2007 zeigen, dass die extrazelluläre K^+ -Konzentration in gelagerten EKs signifikant zunimmt.

Wie in Abb.1.2 dargestellt, wurde in dieser Studie ebenfalls gezeigt, dass in gelagerten EKs der Laktat Gehalt zu und damit der pH-Wert abnimmt. Auch der Gehalt an freiem Hämoglobin wird durch Lagerung deutlich verändert, er steigt mit der Zeit signifikant an (Abb. 1.2) (Bennett- Guerrero et al., 2007).

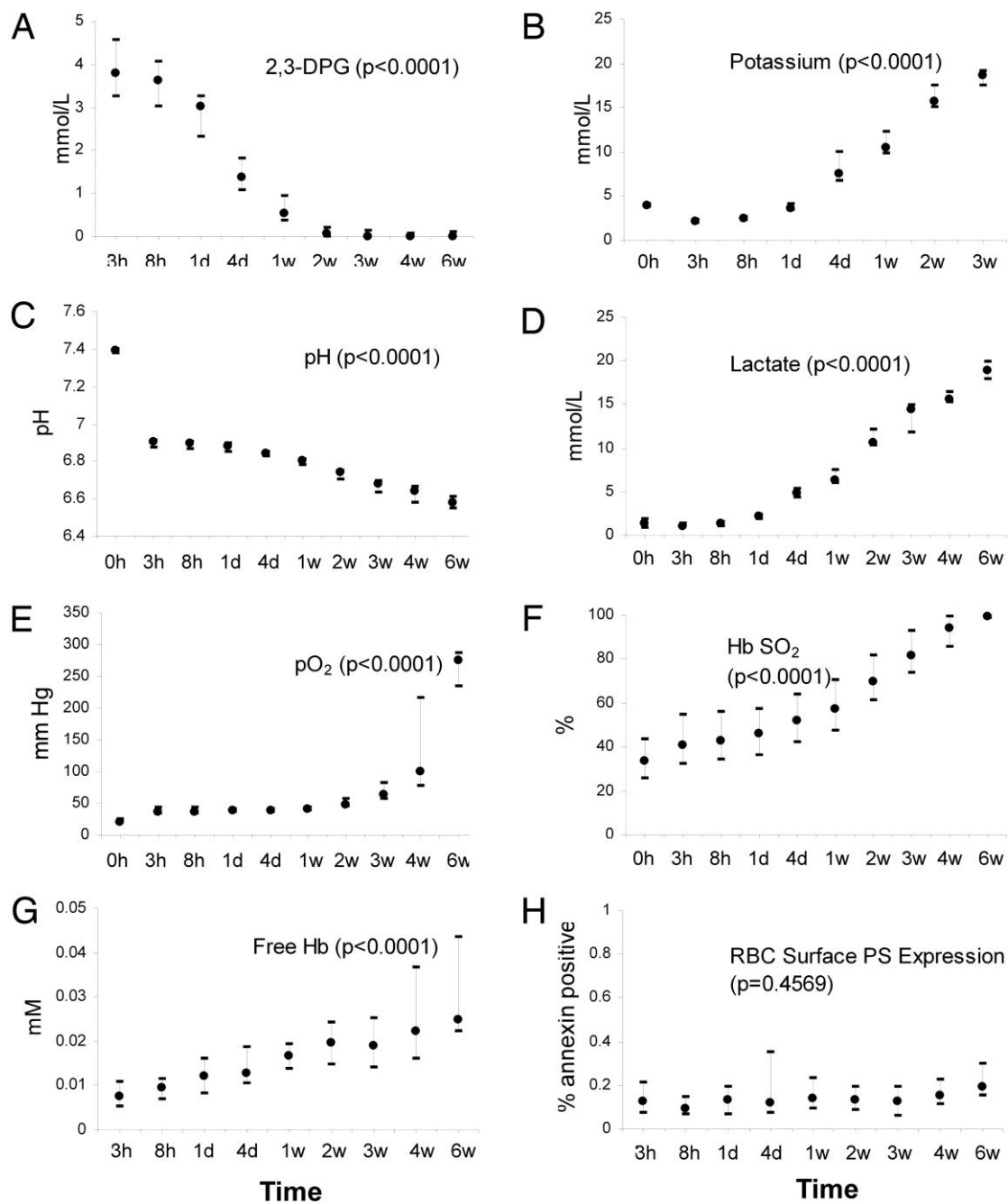


Abb. 1.2 Biochemische storage lesions

Einfluss der Lagerungsdauer auf den Gehalt an 2,3-DPG (A), den Kaliumgehalt (B), den pH-Wert (C), den Sauerstoffpartialdruck (E), die Sauerstoffsättigung, den Gehalt an freiem Hb (G) sowie auf die Expression von RBC Phosphatidylserine (PS) in EKs.

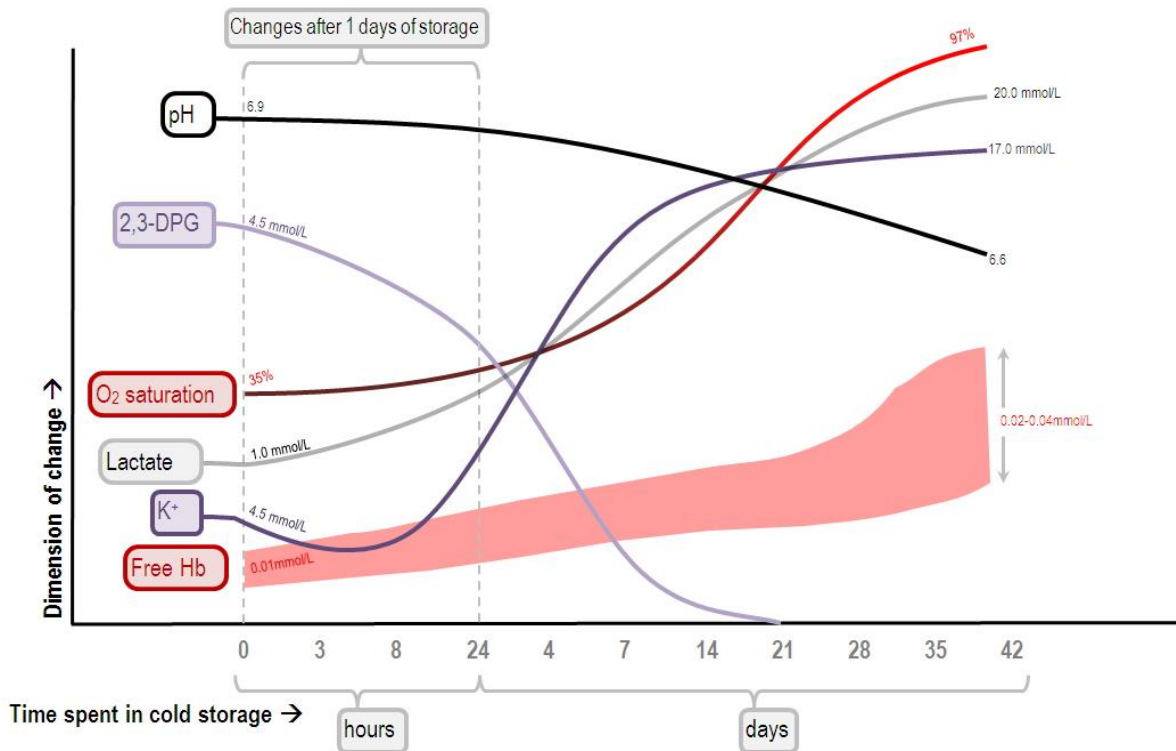
aus: Bennet-Guerrero, 2007

Während der Lagerung können außerdem Zellbestandteile wie oxidierte Membran Lipide oder Proteine akkumulieren, wodurch es unter anderem zu proinflammatorischen Effekten nach Transfusion kommen kann (Babaev et al., 2014; Silliman et al., 2011).

Der Adenosintriphosphat Wert (ATP Wert) sinkt während der Lagerung der EKs um bis zu 80%, was neben Beeinflussung des Stoffwechsels, zumindest teilweise, eine Veränderung der Morphologie der EKs nach sich ziehen kann (Chin-Yee et al., 1997; Aubron et al., 2013).

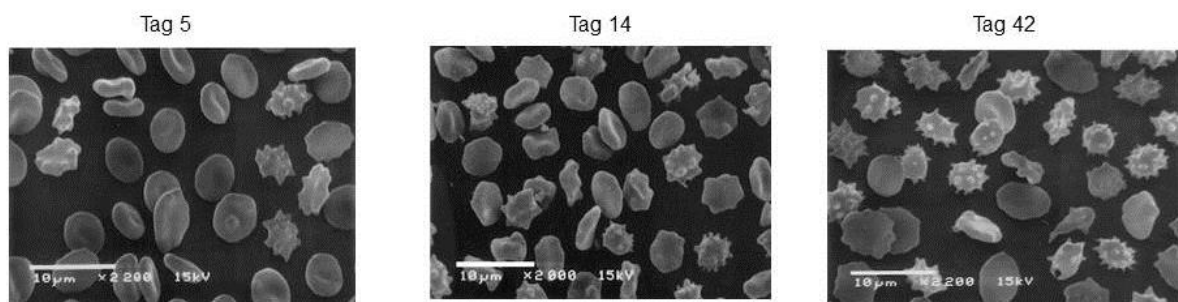
Die ca. 8µm großen Erythrozyten sind leicht verformbar, was ihnen die essentielle Eigenschaft verleiht, auch durch Kapillaren zu fließen, deren Durchmesser geringer ist als ihr eigener. Diese Gefäße, in denen der Gasaustausch von Blut und Gewebe stattfindet, haben einen Durchmesser zwischen 2 und 6µm. (Lang et al., 2005 S.420-423; Almac und Ince, 2007). Unter anderem wird diese Eigenschaft der Formveränderung der Erythrozyten ermöglicht durch eine bikonkave Zellform, ein spezielles Oberflächen-Volumen Verhältnis sowie die intrazelluläre Viskosität (Almac und Ince, 2007). Relevy et al. konnten 2007 in einer Studie zeigen, dass es bei einer *ex-vivo* Kühlagerung schon nach zwei Wochen zu signifikanten Veränderungen in der Struktur der Erythrozyten kommt, durch die die Fließeigenschaften deutlich verändert werden. Die Rigidität wird erhöht und die Adhärenz zwischen Erythrozyten und Endothelzellen deutlich verstärkt (Relevy et al. 2007).

A



aus: www.derangedphysiology.com/main/required-reading/haematology-and-oncology/Chapter%203.0.4/storage-lesions-banked-red-blood-cells

B



Aus: Berezina et al., 2002

Abb. 1.3 Storage Lesions

Biochemische (A) und morphologische (B) Veränderungen in Erythrozytenkonzentraten bei kalter Lagerung (4°C)

Ob bzw. welche klinischen Auswirkungen die *storage lesions* für die Empfänger der Transfusionen haben, wurde in zahlreichen Studien untersucht. Hierbei gibt es vor allem Veröffentlichungen über die Auswirkungen bei Intensiv- und Herzchirurgie Patienten sowie bei Patienten mit akuten Traumata. Diese Studien divergieren teilweise erheblich in ihren Ergebnissen. Yap oder Shah und Kollegen konnten beispielsweise keinen Zusammenhang zwischen dem Alter der verabreichten Transfusion und einer erhöhten Mortalität oder Morbidität bei kardiochirurgischen Patienten feststellen (Yap et al, 2008; Shah et al., 2016). Dagegen wiesen andere Studien sehr wohl eine Korrelation zwischen der Gabe alter EKs und einer erhöhten Mortalität und Komplikationsrate nach kardialen Operationen nach. Diese Komplikationen schlossen unter anderem Nierenversagen, postoperative Infektionen sowie Multiorganversagen ein (Koch et al., 2008; Robinson et al., 2010).

Viele Autoren konnten auch einen Zusammenhang von lagerungsbedingten Schädigungen der EKs und einer Transfusion Related Acute Lung Injury (TRALI) finden (Silliman et al., 2014; Janz et al., 2013). Hier scheinen die im Medium akkumulierten Lipide den inflammatorischen Reiz für die Lungenentzündung zu setzen (Silliman et al., 2014).

Die Varietät der Ergebnisse der unterschiedlichen Studien ist unter anderem durch die sehr heterogenen Studiendesigns zu erklären. So gibt es keine einheitliche Definition „alter“ EKs. Auch die Konservierungsmedien der EKs sind nicht in allen Studien gleich (Zubair, 2010; Aubron, 2013). Studien zu den Auswirkungen von gelagerten Bluttransfusionen auf die Morbidität oder Mortalität von Patienten mit einer Lebererkrankung gibt es kaum.

1.2. Leberregeneration

Obwohl Hepatozyten ausdifferenzierte Zellen sind, sind sie in der Lage, wieder in den Zellzyklus zu gelangen (Bucher, 1991). Diese sehr besondere Eigenschaft ermöglicht es, dass sich die Leber nach einer operativen Entfernung von bis zu 2/3 des Gewebes regenerieren und die ursprüngliche Organgröße zurück erlangen kann (Bucher, 1991; Gilgenkrantz und Collin de l'hortet, 2011). Barash et al. zeigten 2007 im Tiermodell mittels funktioneller Magnetresonanztomographie (fMRI), dass sich die Leber nach einer 70% PHx regenerieren und schon nach einigen Tagen sogar durchschnittlich 115% ihrer ursprünglichen Größe aufweisen kann (Barash et al., 2007). Schon kurze Zeit nach der PHx beginnt der Prozess der Leberregeneration, welcher in drei Phasen eingeteilt werden kann (Gilgenkrantz und Collin de l'hortet, 2011).

In der ersten Phase, der „priming Phase“, treten die ruhenden Hepatozyten von der G0-Phase in die G1-Phase über. Nicht-Parenchymzellen wie Kupfer-Zellen sezernieren nach Bindung von Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α) verschiedene Zytokine. Hierbei spielt v.a. Interleukin-6 (IL-6) eine wichtige Rolle (Gilgenkrantz und Collin de l'hortet, 2011). Dieses induziert nach Rezeptorbindung auf Hepatozyten die Expression des Transkriptionsfaktors STAT-3 (signal transducer and activator of transcription 3) (Gilgenkrantz und Collin de l'hortet, 2011, Riehle et al, 2011), der wiederum die Transkription verschiedener Immediate Early Genes, wie c-fos oder c-myc induziert (Gilgenkrantz und Collin de l'hortet, 2011).

Während der zweiten Phase, der „Teilungsphase“, kommt es durch metabolische Veränderungen der Leber im Rahmen einer vorübergehenden Lipolyse zu Lipideinlagerungen in den Hepatozyten. Weiter werden aus verschiedenen Geweben Wachstumsfaktoren wie EGF (Epidermal Growth Factor) oder HGF (Hepatocyte Growth Factor) ausgeschüttet, welche an EGF- und c-Met-Rezeptoren der Hepatozyten binden. Diese Bindung bewirkt die Progression des Zellzyklus (Gilgenkrantz und Collin de l'hortet, 2011).

In der dritten Phase, der „Terminationsphase“, wird die Proliferation des Lebergewebes durch unterschiedliche Stopp Signale beendet (Gilgenkrantz und Collin de l'hortet, 2011). In diesem Prozess spielen zum einen der TGF- β

(transforming growth factor beta) Signalweg (Romero-Gallo, 2005) und zum anderen die Wirkung von Activin a (Oe et al., 2004) eine Rolle.

Während der regenerativen Prozesse nach einer PHx kommt es in der Leber zu hämodynamischen Veränderungen (Barash et al., 2008). Die Proliferation der Parenchymzellen der Leber verläuft sehr viel schneller als die Angiogenese, weswegen die vaskuläre Dichte der Leber während der Regenerationsprozesse vermindert ist. Dies konnten Barash und Kollegen 2008 in einer Studie histologisch darstellen (Barash et al., 2008). Unter anderem durch diese verminderte Gefäßdichte kommt es vorübergehend zu einer Reduktion der Leberperfusion. Gleichzeitig ist der O₂ -Bedarf der Leber aber durch die Regenerationsprozesse deutlich erhöht. Ein Mechanismus, um den O₂ Gehalt im Lebergewebe zu steigern, ist deswegen eine Erhöhung der Blutzufuhr über die Leberarterie statt über die Portalvene. Im Laufe der Regeneration ändert sich die Blutzufuhr wieder dahingehend, dass der größte Teil des zufließenden Blutes die Leber wieder über die Portalvene erreicht. Diese hämodynamischen Änderungen lassen sich mittels fMRI darstellen (Barash et al., 2008).

1.3. Einfluss von Bluttransfusionen auf die Leberregeneration

Nur wenige Studien befassten sich bisher mit der Fragestellung, ob das Alter von EKs die Regeneration der Leber beeinflusst. In tierexperimentellen Studien konnte allerdings schon gezeigt werden, dass die Transfusion von gelagerten EKs sowohl Entzündungsreaktionen und Koagulopathien verursachen als auch die Gewebsoxygenierung beeinträchtigen.

Matot et al führten 2013 eine Studie am Rattenmodell durch, in der sie den Einfluss von frischen bzw. gelagerten EKs auf die Perfusion und Oxygenierung der Leber bestimmten. Sie konnten mittels fMRI darstellen, dass eine Transfusion von frischen EKs nach einem experimentell herbeigeführten Blutverlust die Leberperfusion nahezu normalisiert. Dagegen war bei Ratten, denen nach dem Blutverlust gelagerte EKs verabreicht worden waren, die Perfusion und Oxygenierung der Leber deutlich reduziert.

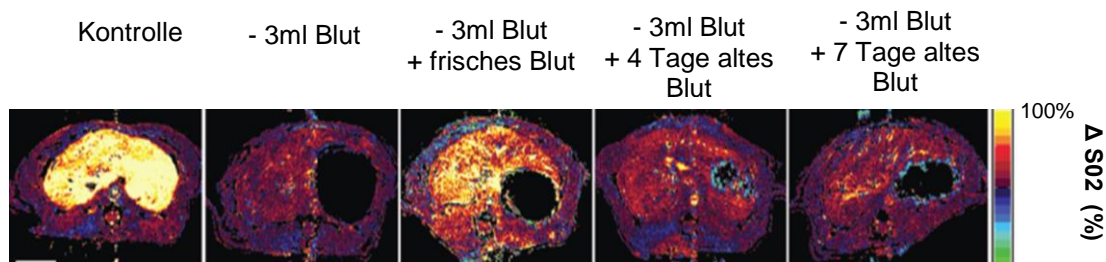


Abb. 1.4 Einfluss der Transfusion von frischen und alten Erythrozyten auf die Oxygenierung des Lebergewebes der Ratte

Sprague-Dawley Ratten wurde zunächst 3 ml Blut entnommen und anschließend der Blutverlust durch Transfusion mit frischen oder alten Erythrozyten ausgeglichen. Die Oxygenierung des Lebergewebes wurde mittels fMRI bestimmt.

aus: Matot et al., 2013

Weiter konnten wir in unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass bei Ratten, denen zusätzlich zu einer PHx ein weiterer Blutverlust zugeführt wurde, zum einen die Hypoxie im Lebergewebe verlängert ist, zum anderen ist die Regeneration der Leber deutlich verzögert. Dieser Effekt ändert sich nicht nach Volumenausgleich mit einer kolloidalen Lösung (HAES). Ein Volumenausgleich mit EKs scheint also unumgänglich (Matot et al., 2017). Deswegen interessierten wir uns dafür, ob bzw. wie EKs unterschiedlichen Alters die Oxygenierung humaner Zellen bzw. wie sie die Anpassungsfähigkeit der Ratten- und Humanzellen an hypoxische Bedingungen

beeinflussen. Hierbei spielen Hypoxie-induzierbare-Faktoren (HIFs) und deren Zielgene eine entscheidende Rolle.

1.4. Hypoxie induzierbare Faktoren (HIFs)

Um einen Zell- oder Gewebsschaden aufgrund einer unzureichenden O₂-Versorgung zu vermeiden, hat der Körper komplexe kardiovaskuläre, respiratorische und hämatologische Mechanismen zur Anpassung an hypoxische Bedingungen entwickelt (Franke et al., 2013). Durch Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren kommt es zu Änderungen in der Genexpression, wobei HIF-1 α eine zentrale Rolle in diesem Prozess spielt (Fandrey und Gassmann, 2009).

Der ubiquitär in Körperzellen vorkommende Transkriptionsfaktor HIF-1 gehört zu der Gruppe der Hypoxie-induzierbaren Faktoren und ist somit Teil eines Sensorsystems, welches dem Körper ermöglicht, einen gewissen Grad an Hypoxie auszugleichen (Schmidt et al., 2007). Das 120 kDa große HIF-1 α bildet zusammen mit HIF-1 β , 97 kDa groß, das Heterodimer HIF-1 (Wang et al., 1995).

Steht dem Körper genug Sauerstoff zur Verfügung, wird die HIF-1 α Untereinheit im Zytosol abgebaut, in dem in O₂ abhängigen Reaktionen HIF-1 α hydroxyliert wird. Zum einen geschieht dies enzymatisch durch Prolinhydroxylasen, kurz PHDs (Maxwell, 1999) und zum anderen durch die Aspariginhydroxylase FIH (Factor-Inhibiting HIF-1), welche einen Aspariginrest hydroxyliert (Lando et al., 2002). In diesem nun veränderten Zustand erkennt das von Hippel-Lindau Protein die HIF-1 α Untereinheit und markiert diese für die proteasomale Degradation (Maxwell, 1999). Liegen hypoxische Bedingungen vor, entfällt die Hydroxylierung, da die PHDs hierfür molekularen Sauerstoff benötigen. HIF-1 α wird nicht degradiert, akkumuliert und wird in den Zellkern transloziert, wo es mit der HIF-1 β Untereinheit das transkriptionsaktive Heterodimer bildet. Dieses Heterodimer reguliert die Expression von Zielgenen, welche essentiell für die Umstellung der Zellen auf hypoxische Bedingungen sind. Dies sind vor allem solche Zielgene, die eine anaerobe Glykolyse stimulieren und solche, die die Gewebsoxygenierung beispielsweise durch Angiogenese oder Vasodilatation verbessern (Fandrey et al., 2006).

2007 beschrieben Frede et al., dass in entzündlichen Geweben, die unter anderem durch einen geringen Sauerstoffgehalt und einen hohen Gehalt an inflammatorischen Zytokinen gekennzeichnet sind, HIF-1 α nicht nur posttranslational durch Hypoxie reguliert wird sondern auch durch verschiedene entzündliche Mediatoren auf Genexpressionsebene (Frede et al.,2007).

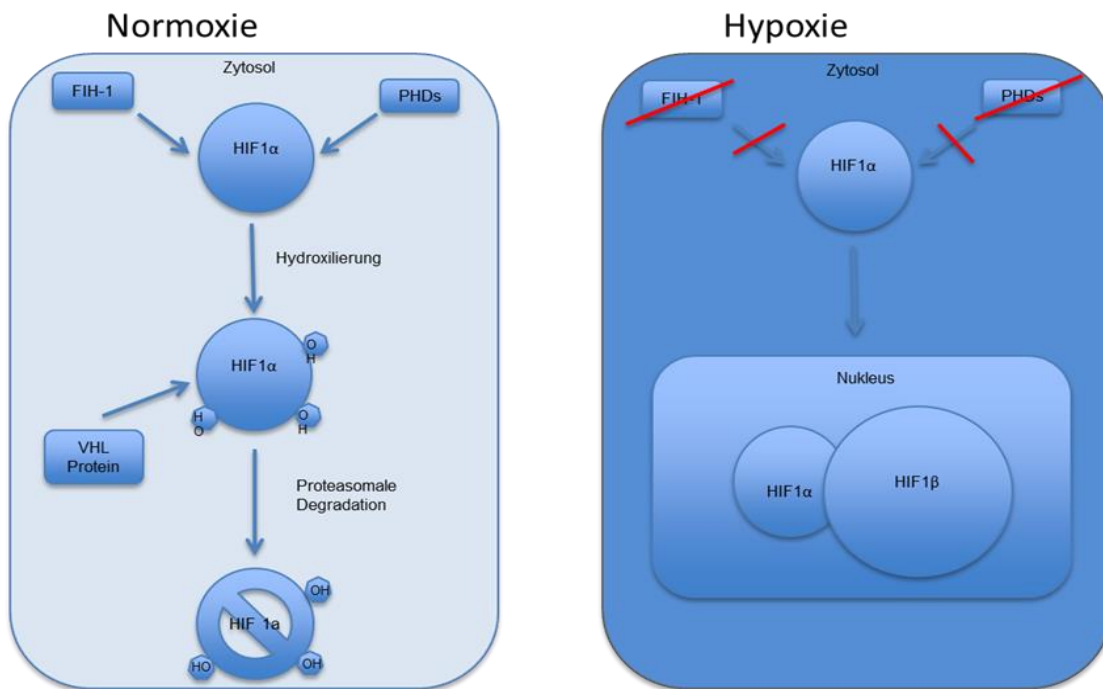


Abb.1.5 Schematische Darstellung der HIF-1 α Regulierung unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen

Die weit über 100 verschiedenen HIF Zielgene (Elvidge et al., 2006; Schödel et al., 2011) regulieren diverse Zellmechanismen, die vor allem bei der Anpassung des Körpers an hypoxische Bedingungen wichtig sind. Dies sind wie oben bereits erwähnt zum einen die Optimierung der Aufnahme des noch vorhandenen Sauerstoffs, zum Beispiel durch Angiogenese oder Vasodilatation, zum anderen die verstärkte Energiegewinnung durch anaerobe Glykolyse (Fandrey et al., 2006).

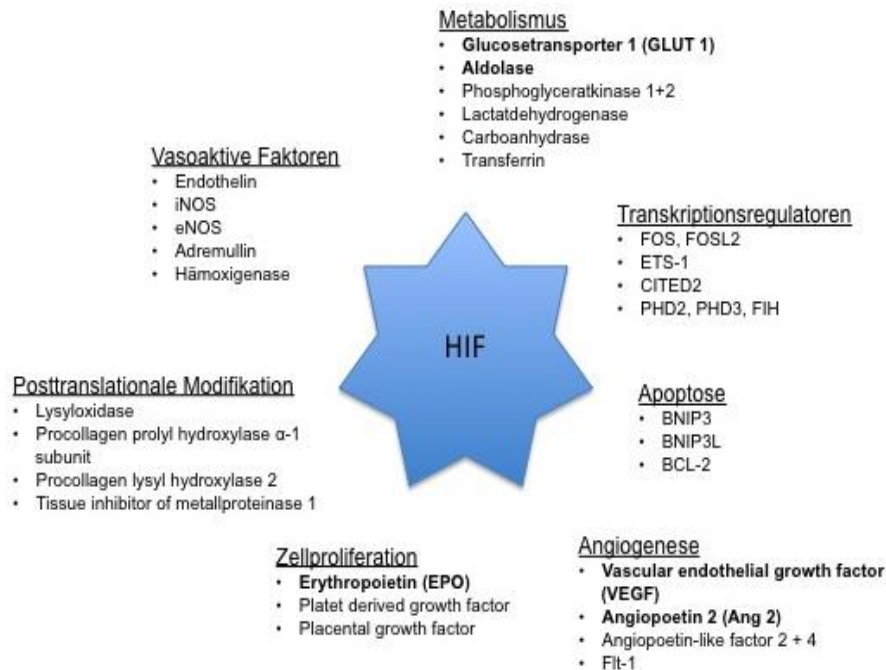


Abb.1.6 Auswahl HIF- Zielgene

Die in der Abbildung hervorgehobenen Zielgene wurden in dieser Arbeit besonders berücksichtigt, modifiziert nach Frede und Fandrey, 2013

Auch während Entzündungsprozessen, wie sie bei Lebererkrankungen auftreten, entwickeln sich im Lebergewebe hypoxische Bedingungen. Der O_2 - und Glukosegehalt im betroffenen Gewebe sinkt deutlich, wohingegen die Konzentration an inflammatorischen Zytokinen und Sauerstoffradikalen merklich steigt (Cramer und Johnson, 2003; Karhausen et al., 2005). Bisher gibt es nur wenige Untersuchungen über die HIF Regulation während des Prozesses der Leberregeneration. Im Tiermodell konnten Maeno und Kollegen 2005 zeigen, dass es nach einer 70% Hepatektomie zu einer signifikanten Hochregulation von HIF-1 α in Endothelzellen der Lebersinusoide kommt (Maeno et al., 2005). Ob die HIF Regulation im Lebergewebe durch Bluttransfusionen unterschiedlichen Alters beeinflusst wird, ist bisher nicht bekannt.

1.5. HIF Zielgene

1.5.1. Aldolase

Das Enzym Aldolase ist ein wichtiger Bestandteil der Glykolyse, da es als Schlüsselenzym die Spaltung von Fructose-1,6-bisphosphat zu Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) und Glycerinaldehyd-3-phosphat (GADP) katalysiert (Stryer et al., 1994). Diese Reaktion ist reversibel und die entgegengesetzte Reaktion, die Umwandlung von DHAP zu Fructose-1,6-bisphosphat während der Gluconeogenese wird ebenfalls von Aldolase katalysiert, so dass das Enzym auch hier eine Schlüsselrolle einnimmt (Dalby et al. 2001). Man unterscheidet drei verschiedene Isoformen. Gewebespezifisch tritt Isoform A in Erythrozyten und Muskelzellen auf, Isoform B in Leber- und Nierenzellen und die dritte Form, Isoform C, in Gehirnzellen. Die vor allem in der Leber vorkommende Aldolase B katalysiert zusätzlich zur oben genannten Reaktion die Spaltung von Fructose-1-Phosphat zu DHAP und Glycerinaldehyd (Dalby et al. 2001). Aldolase zählt zu den Zielgenen der Hypoxie induzierbaren Faktoren. Unter hypoxischen Umständen wird im Rahmen der Umstellung auf ATP (Adenosintriphosphat) Gewinnung durch Glykolyse die Expression von Aldolase erhöht (Semenza et al, 1996). Eine Erhöhung der Aldolase B Aktivität ist vor allem bei Schädigung von Leberzellen, wie sie zum Beispiel bei akuter bzw. chronischer Hepatitis, oder bei Leberzirrhose auftritt nachweisbar (Taguchi und Takagi, 2001).

1.5.2. Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (VEGF)

Der *Vascular Endothelial Growthfactor* (VEGF) ist ein für vaskuläre Endothelzellen spezifischer Wachstumsfaktor (Ferrara und Henzel, 1989), der sowohl die physiologische als auch die pathologische Angiogenese maßgeblich beeinflusst (Ferrara, 2009). In pathologischen Prozessen spielt VEGF vor allem in der Angiogenese von Tumoren (Plate et al., 1992), bei Krankheiten mit erhöhter Neovaskularisation wie beispielsweise der diabetischen Retinopathie (Aiello et al., 1994) sowie während der Wundheilung (Brown et al., 1992) eine wichtige Rolle.

Verschiedene Zytokine, Wachstumsfaktoren und Gonadotropine haben Einfluss auf die VEGF Expression (Neufeld et al., 1999, Ohero und Sahali, 2015). VEGF gilt als HIF-Zielgen und somit wird die VEGF Expression unter hypoxischen Bedingungen induziert (Levy et al., 1995; Vincent et al., 2000, Ohero und Sahali, 2015). VEGF induziert im Prozess der Angiogenese eine Vasorelaxation, eine erhöhte Gefäßpermeabilität sowie eine vermehrte endotheliale Zellmigration und Proliferation (Karkkainen und Petrova, 2000, Ylä-Herttuala, 2007). Außerdem fördert VEGF das Wachstum und verhindert apoptotische Prozesse in endothelialen Zellen. (Kajdaniuk et al., 2011)

1.5.3. Erythropoietin (EPO)

Das Knochenmark synthetisiert unter physiologischen Bedingungen ca. 2,5 Millionen Retikulozyten, die Vorläuferstadien von Erythrozyten, pro Sekunde, da Erythrozyten nur eine Lebensdauer von 100-120 Tagen haben und somit ständig erneuert werden müssen (Jelkmann, 2013). Aus pluripotenten Stammzellen des Knochenmarks bilden sich in mehreren Zwischenschritten die hämatopoetischen Zellen. Vorläuferzellen der Erythrozyten sind die BFU-Es (Burst Forming Units-Erythroid), welche sich weiter zu CFU-Es (Colony Forming Units- Erythroid) und schließlich zu Erythrozyten ausdifferenzieren (Hattangadi et al., 2011). EPO bindet an den transmembranen EPO-Rezeptor (EPO-R), der sich unter anderem auf den CFU-Es befindet. Durch die Bindungen des Liganden wird die Rezeptor-assoziierte Januskinase-2 (JAK-2) aktiviert, welche wiederum die Phosphorylierung des Rezeptors katalysiert. Phosphoryliert dient der Rezeptor als Bindungsstelle für verschiedene intrazelluläre Proteine wie z.B. STAT-5. Diese Proteine verhindern eine Apoptose und fördern die Differenzierung und Proliferation der Zellen (Jelkmann, 2013).

Unter hypoxischen Bedingungen steigt die Plasmakonzentration von EPO auf über das 1000-fache an (Jelkmann, 1992). Durch eine vermehrte EPO Produktion wird die Erythropoiese stimuliert und somit die O₂-Transportkapazität des Blutes und die Sauerstoffversorgung des Gewebes verbessert (Erslev und Gabuzda, 1985). Neben der Schlüsselrolle in der Erythropoiese sind für EPO weitere Aufgaben im Organismus beschrieben. Der EPO Rezeptor befindet sich nicht nur auf

Vorläuferzellen von Erythrozyten, sondern auch auf anderen Zellarten wie Endothel- oder Nervenzellen. So ist EPO auch an Vorgängen wie der Angiogenese, der Apoptose Inhibition oder der Mobilisation von intrazellulärem Calcium beteiligt (Lappin et al., 2002).

1.5.4. Angiopoietin 2 (ANG-2)

Die Gruppe der Angiopoietine besteht aus vier Glykoproteinen (ANG-1 bis ANG -4), die als Wachstumsfaktoren für Endothelzellen in der Angiogenese sowie als Regulatoren der endothelialen Barriere eine wichtige Rolle spielen (Thomas und Augustin, 2009).

ANG-2 wird in erster Linie von Endothelzellen exprimiert (Thurston und Daly, 2012) und dort in den sogenannten Weibel-Pallade-Körperchen gespeichert (Fiedler et al., 2004). Unter physiologischen Bedingungen ist die ANG-2 Sekretion sehr gering (Thurston und Daly, 2012), sie kann durch Hypoxie HIF-1 α abhängig induziert werden (Simon et al., 2008) und wird außerdem durch den Wachstumsfaktor VEGF stimuliert (Oh et al. 1999). Vermehrte Expression von ANG-2 ist in Geweben mit einer hohen Angiogeneserate, wie beispielsweise in tumorösem Gewebe, zu beobachten. Zudem wird die ANG-2 Expression durch Inflammation erhöht (Thurston und Daly, 2012). Durch ANG-2 wird ruhendes Endothel destabilisiert und für exogene Stimuli wie beispielsweise inflammatorische Reize durch Zytokine sensibilisiert (Fiedler und Augustin, 2006). Außerdem zeigt sich, dass ANG-2 im Endothel eine Hyperpermeabilität verursachen kann (Parikh et al., 2006, Semenza et al., 2010).

1.5.5. Glukosetransporter 1 (GLUT-1)

Glukose stellt in der Energiegewinnung von Säugerzellen eine Schlüsselrolle dar, da durch ihre Umsetzung sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen ATP gewonnen werden kann (Bell et al., 1993).

Die Familie der Glukosetransporter (GLUT) umfasst 14 transmembranäre Proteine, die den passiven Transport von Glukose und anderen Hexosen durch Zellmembranen ermöglichen (Uldry und Thorens, 2004).

Der Glukosetransporter-1 (GLUT-1), ein transmembranäres Protein wird ubiquitär exprimiert und kommt in zahlreichen fetalen sowie adulten Geweben vor (Mueckler, 1994). Besonders hoch ist die GLUT-1 Expression in Zellen der Blut-Hirn Schranke sowie in Erythrozyten (Kahn, 1992). In der Leber wird GLUT-1 unter physiologischen Bedingungen nur von den Hepatozyten exprimiert, die um die terminalen hepatischen Venen gelagert sind, im Hungerzustand dagegen exprimieren auch die übrigen Hepatozyten GLUT-1 (Tal et al., 1994). Die Expression von GLUT-1 wird von zahlreichen Stimuli beeinflusst. So steigern beispielsweise Wachstumsfaktoren (Mueckler, 1994) oder Tumornekrosefaktor- α (Stephens et al., 1992) die GLUT-1 Expression, wohingegen Glukose die GLUT-1 Expression supprimiert (Mueckler, 1994). 1992 zeigten Loike et al., dass GLUT-1 unter hypoxischen Bedingungen vermehrt exprimiert wird, was die Umstellung der Zelle von aerober auf anaerobe Glykolyse verdeutlicht (Loike et al., 1992).

1.6. Für die Fragestellung relevante Zytokine

1.6.1. Interleukin 1 β (IL-1 β)

Interleukin-1 β (IL-1 β) gehört als Mitglied der Interleukin-1 Familie zu den wichtigsten Mediatoren des angeborenen Immunsystems (Weber et al., 2010).

Neben hämatopoetischen Zellen wie Monozyten, Gewebsmakrophagen und dendritischen Zellen (Dinarello und v.d.Meer, 2013) synthetisieren und sezernieren auch andere Zelltypen wie zum Beispiel Endothelzellen oder Fibroblasten IL-1 β (Dinarello, 1991, Weber et al., 2010). Unter physiologischen Bedingungen wird IL-1 β nur sehr gering exprimiert, gesteigert wird die Expression durch Infektionen und mikrobielle Toxine (Dinarello, 1991; Weber et al. 2010), aber auch durch Gewebsschädigung oder andere Arten von Zellstress (Mankan et al., 2012).

IL-1 β hat eine große Breite an biologischen Effekten, wozu zahlreiche proinflammatorische Eigenschaften zählen. So wird sowohl die Anzahl an neutrophilen Granulozyten als auch die Expression von Cyclooxygenasen (COX)

durch IL-1 β erhöht, was wiederum das zu einem erhöhten Prostaglandin E2 Level mit pyrogener Wirkung führt (Dinarello, 2005). Weiter aktiviert IL-1 β beispielsweise Endothelzellen, wodurch es zu einer vermehrten IL-6 Produktion kommt (Weber et al., 2010; Dinarello 2005).

1.6.2. Interzelluläres-Adhäsions-Molekül-1 (ICAM-1)

Das *Intercellular Adhesion Molecule 1* (ICAM-1), auch Cluster of Differentiation 54 (CD54) genannt, ist ein transmembranes Glykoprotein, das vor allem auf Endothelzellen und Leukozyten, aber in geringem Ausmaß auch auf anderen Zelltypen wie Thrombozyten oder Fibroblasten zu finden ist (Ramos et al., 2014).

Endotheliales ICAM-1 spielt im Rahmen der Diapedese eine wichtige Rolle bei der interzellulären Adhäsion zwischen Endothelzellen und Leukozyten, in dem es an das Leucocyte Function Associated Molecule (LFA-1) oder an das Makrophage-1 Antigen (MAC-1) bindet (Bella et al., 1998). Exprimiert auf Monozyten bzw. auf Makrophagen nimmt ICAM-1 eine wichtige unterstützende Funktion bei der Antigenpräsentation und der Aktivierung von T-Zellen ein (van de Stolpe und van der Saag, 1995). Die Expression von ICAM-1 wird zellspezifisch durch verschiedene Zytokine, wie Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Interleukin-1 oder Interferon-1 stimuliert (van de Stolpe und van der Saag, 1995). Winning et al. konnten 2010 zeigen, dass die Expression von ICAM-1 auf monozytären Zellen, unabhängig von Zytokinen und HIF, durch hypoxische Bedingungen stimuliert wird. Dieser Vorgang ist NF- κ B (Nuclear Factor- κ B) abhängig. Weiter konnte gezeigt werden, dass auch die Expression von monozytärem ICAM-1 den Vorgang der Zelladhäsion zwischen Monozyten und Endothelzellen verstärkt (Winning et al., 2010).

1.6.3. Interleukin-8 (IL-8)

Interleukin-8 (IL-8), auch CXCL-8 genannt, ist ein Chemokin und wird vor allem von Endothel- und Epithelzellen, neutrophilen Granulozyten und Makrophagen (Baggiolini und Clark-Lewis, 1992), aber auch von anderen Zellen wie Hepatozyten oder Kupffer Zellen sezerniert (Hill et al., 1993). Unter physiologischen Umständen exprimieren

diese Zellen fast gar kein IL-8, dahingegen können Stimuli wie IL-1, TNF, bakterielle oder virale Reize sowie zellulärer Stress eine Hochregulation der IL-8 Sezernierung um das 10- bis 100fache bewirken (Hoffmann et al., 2002).

IL-8 hat eine chemotaktische Wirkung auf neutrophile Granulozyten und veranlasst diese zur Freisetzung intrazellulärer Granula (Baggiolini und Clark-Lewis, 1992). Weiter ist IL-8 ein potenter Angiogenese Faktor sowohl während der physiologischen Angiogenese als auch unter pathologischen Umständen wie der Tumor Metastasierung (Jiang, 2011).

1.6.4. C-reaktives Protein (CRP)

CRP ist ein Pentraxin, welches vor allem von Hepatozyten synthetisiert wird. Ein marginaler Teil des CRPs kann aber auch von Lymphozyten (Kuta und Baum, 1986), Monozyten, Kupffer Zellen und Alveolarmakrophagen produziert werden (Dong und Wright, 1996). Als Akute-Phase Protein hat CRP viele immunregulatorische Funktionen wie die Opsonierung von Bakterien, Aktivierung der Phagozytose sowie die Aktivierung der klassischen Komplementkaskade (Dong und Wright, 1996).

Nach Aktivierung des Komplementsystems wird über verschiedene Vorstufen das Protein C5 in die Komplementfragmente C5a und C5b gespalten. Gemeinsam mit anderen Komplementfragmenten bewirkt C5a unter anderem durch Erhöhung der Gefäßpermeabilität eine lokale inflammatorische Reaktion (Heinrich et al., 2014).

1.7. Fragestellung der Arbeit

In den meisten Fällen einer partiellen Hepatektomie ist aufgrund des hohen intraoperativen Blutverlustes eine Bluttransfusion nicht zu umgehen. Erstes Ziel der vorliegenden Arbeit war es, am Tiermodell näher herauszufinden, wie sich der gravierende intraoperative Blutverlust und die anschließende Transfusion unterschiedlich lang gelagerter EKs auf den Regenerationsprozess der Leber auswirkt.

Die in der Klinik zum Ausgleich des verlorenen Blutes eingesetzten EKs können eine Lagerdauer von bis zu 42 Tagen haben, in denen verschiedenste Veränderungen an und in den Zellen auftreten (Qu und Triulzi, 2015). Dass diese *storage lesions* klinische Einflüsse auf Morbidität und Mortalität der Patienten haben, konnte bereits in einigen Studien nachgewiesen werden (Koch et al., 2008). Hauptaugenmerk der oben genannten Studien waren Patienten mit Herz- oder Lungenerkrankungen oder solche mit akuten Traumata. Da es nur sehr wenige Studien über den Einfluss der *storage lesions* auf Patienten mit Lebererkrankungen gibt, war ein weiteres Ziel unserer Studie, herauszufinden, ob bzw. wie sich das Alter der EKs auf den Regenerationsprozess der Leber nach einer partiellen Hepatektomie auswirkt.

Matot et al. konnten 2013 zeigen, dass sich die Leberperfusion und -oxygenierung bei partiell hepatektomierten Ratten nach Gabe von frischen EKs fast normalisiert, die Gabe von gealterten EKs dagegen eine reduzierte Perfusion und Oxygenierung der Leber mit sich bringt (Matot et al., 2013). Deswegen setzten wir uns als weiteres Ziel, die zugrunde liegenden Zellmechanismen der veränderten Sauerstoffversorgung des Lebergewebes durch die unterschiedlichen EKs näher zu untersuchen. Zum einen sollte dies durch molekulare Analysen von Lebergewebe teilhepatektomierter Ratten geschehen zum anderen wollten wir die Fragestellung in unterschiedliche humane *in-vitro* Modelle übertragen. Ziel sollte hier sein, herauszufinden, ob frische bzw. gealterte EKs hypoxische oder inflammatorische Reize in solchen humanen Zellen setzen, welche eine wichtige Rolle im Prozess der Leberregeneration spielen.

Die Tierversuche wurden in einer Kooperation mit Dr. Rinat Abramovitch, Hadassah Medical Center, Jerusalem, Israel sowie mit Prof.Dr. Idit Matot, Universität Tel Aviv, Israel durchgeführt.

2. Material und Methoden

2.1. Zellkulturen

2.1.1 HepG2 Zellen

Bei der HepG2 Zelllinie, die ursprünglich aus dem hepatozellulärem Karzinom eines 15jährigen Jungen etabliert wurde, handelt es sich um eine gängige Hepatomzelllinie, die sich sehr gut als *in-vitro* Modell humaner Hepatozyten eignet. HepG2 Zellen ähneln morphologisch Leberparenchymzellen, sie wachsen adhärent als Monolayer, haben einen hyperploiden Chromosomensatz (55 Chromosomen) und synthetisieren diverse Plasmaproteine (Knowles et al., 1980).

Die HepG2 Zellen (ATCC®, Virginia, USA) wurden in RPMI-1640 Medium (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) unter Zusatz von 10% fetalem Kälberserum (FBS-Gold, PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland), 2mM L-Glutamin (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) bei 37°C und 21% O₂ im Brutschrank (Binder, Tuttlingen, Deutschland) in 75cm² Kulturflaschen (Greiner Bio One, Kremsmünster, Österreich) kultiviert. Alle 2 Tage wurde ein Mediumwechsel vorgenommen und je nach Grad der Konfluenz wurden die Zellen alle 3-4 Tage passagiert. Zur Passagierung wurde das Medium abgesaugt, die Zellen wurden mit Phosphat gepufferter Salzlösung (Phosphat buffered saline, PBS, pH7,4,1x, Gibco, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA,) gewaschen und für einige Minuten mit 2ml Trypsin/EDTA (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) im Brutschrank inkubiert, um die adhärenenten Zellen abzulösen. Nach Ablösung der Zellen wurde der Vorgang durch Zugabe von 8 ml Medium gestoppt und die Zellen durch auf- und abpipettieren vom Flaschenboden gelöst und vereinzelt. 2 ml dieser Einzelsuspension wurden auf neue 75cm² Zellkulturflaschen verteilt, in die zusätzlich frisches Medium in oben genannter Zusammensetzung hinzugefügt wurde.

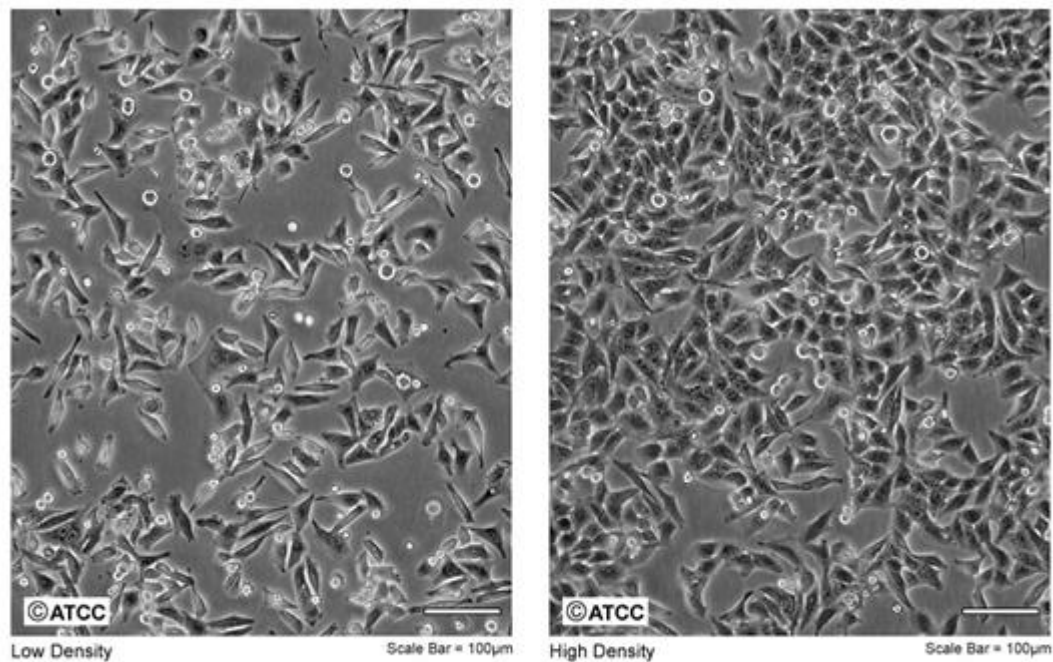


Abb.2. 1 HepG2 Zellen in Zellkultur

Morphologie von HepG2 Zellen bei geringer (ca. 50%) und hoher (ca. 90%) Konfluenz

aus: lgcstandards-atcc.org

2.1.2 THP-1 Zellen

Ursprung der THP-1 Zelllinie, einem weitverbreiteten *in-vitro* Modell zur Untersuchung monozytärer Zellen und deren Funktionen (Chanput et al., 2014), ist das Blut eines an akuter monozytärer Leukämie erkrankten Jungen (Tsuchiya et al., 1980). Sie ähneln humanen Monozyten sowohl hinsichtlich ihrer Morphologie als auch hinsichtlich ihrer Funktionen, wie den sekretorischen Eigenschaften oder der Expression von Membranantigenen (Auwerx, 1991), wachsen in losen Gruppierungen (Tsuchiya et al., 1980) und haben eine Verdoppelungszeit von 35-50 Stunden (Chanput et al., 2014).

Auch die THP-1 Zellen (ATCC®, Virginia, USA) wurden in RPMI-1640 Medium mit Zusatz von fetalem Kälberserum (FBS-Gold) bei einer Temperatur von 37°C, und 21% O₂ im Brutschrank kultiviert. Um eine zu starke Aggregatbildung der Zellen zu verhindern, wurde kein zusätzliches L-Glutamin hinzugefügt. Alle 2 Tage wurde frisches Kulturmedium zugesetzt und einmal wöchentlich wurden die Zellen im Verhältnis 1:8 verdünnt.

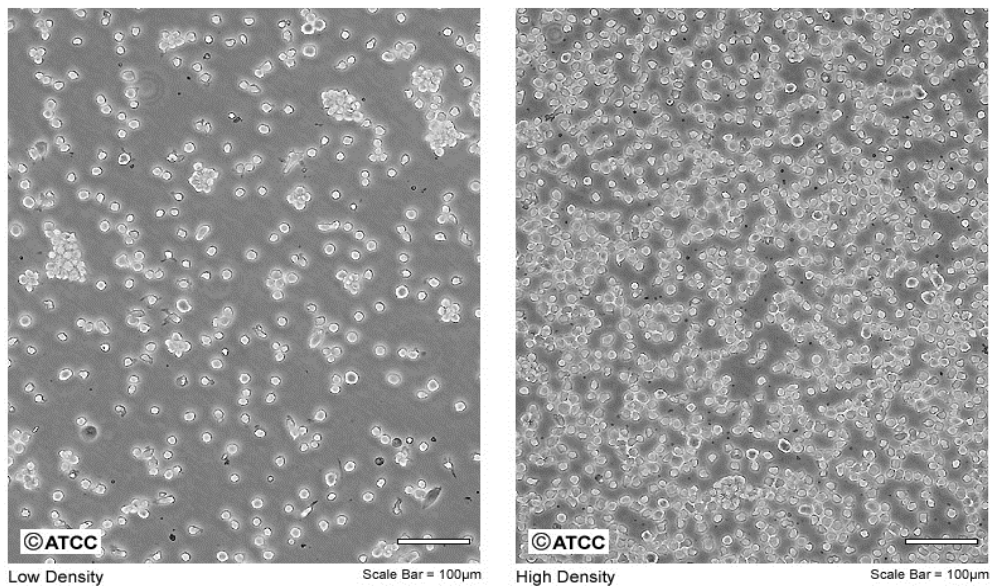


Abb.2. 2 THP-1 Zellen in Zellkultur

Morphologie von THP-1 Zellen in geringer und hoher Dichte

aus: <http://www.lgcstandards-atcc.org/~media/Attachments/7/1/6/2/1967.ashx>

2.1.3 HPME Zellen (HPMEC)

Als Auskleidung von pulmonalen Gefäßen bilden humane pulmonale mikrovaskuläre Endothelzellen (Human Pulmonary Microvascular Endothelial Cells - HPMEC) die Barriere zwischen Blut und Gewebe. Werden diese Zellen aus Lungengewebe isoliert und dann kultiviert, stellen sie ein sehr gutes *in-vitro* Modell zur Erforschung endothelialer Funktionen und Pathomechanismen dar (Unger et al., 2002).

Zur Kultivierung säten wir primäre HPMEC Zellen (PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland) in Endothelial Cell Growth Medium MV2 (PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland) zunächst in 25cm² Zellkulturflaschen (Greiner Bio One, Kremsmünster, Österreich) aus und inkubierten sie bei 37°C im Brutschrank unter normoxischen Bedingungen. Sobald die Zellen einen dichten Zellrasen bildeten, wurden sie mit PBS gewaschen, mit Accutase (Accutase Solution, Promocell, Heidelberg, Deutschland) gelöst und in 75cm² Zellkulturflaschen in MV2 Medium subkultiviert.

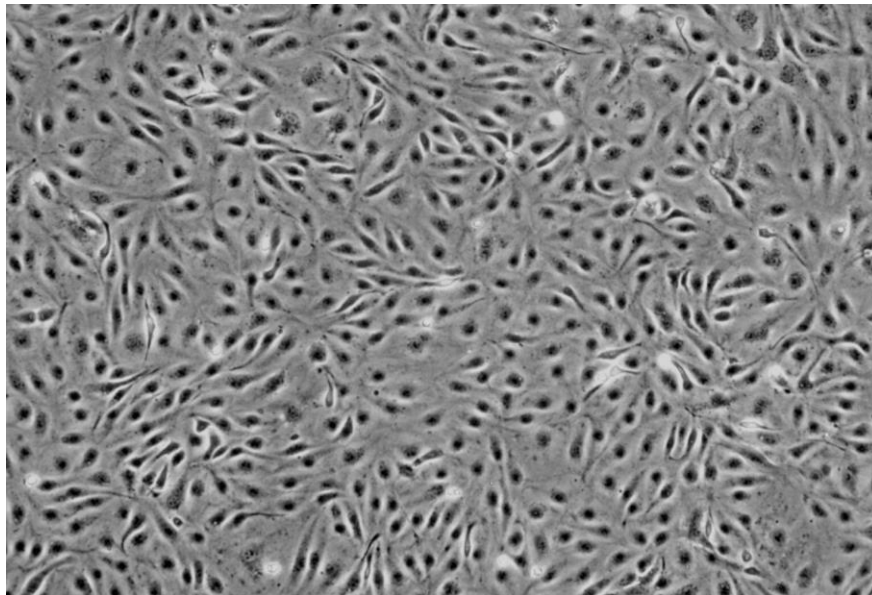


Abb.2. 3 HPMEC in Zellkultur

Morphologie von HPME Zellen

aus: <https://www.sciencellonline.com/human-pulmonary-microvascular-endothelial-cells.html>

2.2. Aufarbeitung der Erythrozytenkonzentrate (EK)

Die Erythrozytenkonzentrate (EK) wurden uns im Rahmen einer Kooperation mit Dr.med. Jochen Hoch (ärztlicher Leiter der Immunhämatologie, Institut für experimentelle Hämatologie und Transfusionsmedizin, Uniklinik Bonn) zur Verfügung gestellt.

Gelagert wurden die EKs bei 2-6°C in Transferbeuteln (PL146, Fenwal, Fresenius, Bad Homburg, Deutschland), versetzt mit Konservierungsmedium bestehend aus 110ml einer Sodium-Adenin-Glucose-Mannitol-Lösung (SAG-Mannitol) als Nährstoffzugabe sowie 70ml einer Citrat-Phosphat-Dextrose Stabilisator Lösung (CPD). Zur Aufarbeitung wurde der Inhalt der EKs in 50ml Zentrifugenröhrchen (Greiner Bio One, Kremsmünster, Österreich,) aufgeteilt und bei 3100 x g in einer Kühlzentrifuge (Centrifuge 5810Rv, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) für 45 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde der Erythrozyten-arme Überstand abpipettiert und in frische 50ml Zentrifugenröhrchen überführt, welche abermals für 45 Minuten bei 3100 x g und 4°C zentrifugiert wurden. Der jetzt Erythrozyten-freie Überstand wurde abgenommen und in 15ml Zentrifugenröhrchen (Greiner Bio One,

Kremsmünster, Österreich) pipettiert, welche bis zur weiteren Nutzung bei 2-6°C gelagert wurden.

2.3. Quantitativer Nachweis von freiem Hämoglobin

Erythrozytenkonzentrate (EK) wurden nach einer Lagerungsdauer von 2, 21 bzw. 42 Tagen wie oben beschrieben aufgearbeitet und anschließend wurde im Labor für klinische Chemie der Universität Bonn der Gehalt an freiem Hämoglobin im Erythrozyten-freien Überstand photometrisch gemessen

2.4. Proliferations- und Vitalitätstest

Um den Einfluss von Überstand von 2 bzw. 42 Tage alten EKs auf die Proliferation und die Vitalität von HepG2 Zellen zu messen, verwendeten wir den MTT-Assay. Das wasserlösliche neon-gelbe MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)2,5diphenyltetrazolium-bromid) wird von lebenden Zellen aufgenommen und zu wasserunlöslichem blau-violettem Formazan reduziert. Diese Reduktion findet intrazellulär statt und wird durch Enzyme des endoplasmatischen Retikulums sowie partiell durch mitochondriale Dehydrogenasen katalysiert (Berridge et al. 1996). Die Menge des Formazans ist spektralphotometrisch messbar und proportional zur Vitalität und Anzahl der lebenden Zellen (Mosmann, 1983).

Für den MTT-Assay wurden HepG2 Zellen auf Zellkulturplatten (96-Well, Greiner Bio One, Kremsmünster, Österreich) ausgesät und solange kultiviert, bis der Zellrasen eine 50%ige Konfluenz erreicht hatte.

Bei Versuchsbeginn wurde das Kulturmedium abgesaugt und pro Well durch 100µl verschiedener Verdünnungsstufen von EK-Überständen ersetzt.

Diese Verdünnungen wurden mit Kulturmedium in den Verhältnissen 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 angesetzt.

Die Zellen wurden für einen Zeitraum von 24 Stunden im Brutschrank (Binder, Tuttlingen, Deutschland) bei 21% Sauerstoff und 37°C inkubiert.

Anschließend wurden pro Well 25µl MTT (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) zugesetzt, welches für eine zweistündige Inkubationszeit im Brutschrank auf den Zellen belassen wurde.

Nach der Inkubation wurden pro Well 100µl Lysingpuffer zugesetzt, um aus den unlöslichen Formazankristallen eine homogene Lösung zu erhalten.

Zur Herstellung des Lysingpuffers wurden 100ml Dimethylformamid (DMF, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) mit 100 ml destilliertem Wasser (Aqua destillata, A.dest.) gemischt, anschließend wurden 10g Sodium Dodecyl Sulfat (SDS, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) bei 37°C in dem Gemisch gelöst. Hierzu wurden 2,5ml 80% Essigsäure und 2,5 ml 1N Chlorwasserstoff (HCL, AppliChem, Darmstadt, Deutschland) gemischt.

Nach Zugabe des Lysingpuffers auf die Zellkulturplatten wurde die optische Dichte (OD) in einem Plate-Reader (Cytation³, BioTek Instruments, Vermont, USA) photometrisch bei einer Wellenlänge von 570nm und einer Referenzwellenlänge von 690nm bestimmt.

2.5. Genexpressionsnachweis

Um den Einfluss von Überständen von unterschiedlich alten EKs auf die Expression verschiedener Gene zu untersuchen, wurden sowohl HepG2 als auch THP-1 und HPMECs für 6 bzw. 24 Stunden mit den entsprechenden Überständen inkubiert. Hierfür wurden die jeweiligen Zellen auf Zellkulturplatten (6-well, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) ausgesät. Versuche mit HepG2 Zellen wurden bei einer Zelldichte von ca. 80% gestartet. Für die Versuche mit THP-1 Zellen wurde zunächst mit Hilfe der Neubauer Zählkammer die aktuelle Zelldichte der Kultur bestimmt, anschließend wurden die Zellen mit einer Dichte von 1.000.000 Zellen/Well ausgesät. HPMECs wurden für die Versuche mit einer Zelldichte von 500.000 Zellen/Well ausgesät.

Überstände von 2, 21 und 42 Tage alten EKs wurden mit Kulturmedium jeweils in einer Konzentration von 1:5 (20%) verdünnt und auf die Wells aufgetragen. Die Zellen wurden dann bei 37°C unter normoxischen (21%O₂) oder hypoxischen (1%O₂) Bedingungen wie beschrieben inkubiert.

Nach 6 bzw. 24 Stunden wurden die Versuche beendet und die Zellen wie folgt weiter verarbeitet.

HepG2

Das Zellkulturmedium wurde abgenommen, die Zellen mit 1ml Trizol (Ambion-life-technologies, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) lysiert, mit einem Zellschaber (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) vorsichtig von der Platte gelöst, in ein 1,5ml Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) überführt und bei -80°C eingefroren.

THP-1

Der Inhalt der jeweiligen Wells wurde durch vorsichtiges auf- und abpipettierend gemischt, in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt und anschließend für 10 Minuten bei 450 x g zentrifugiert, wodurch sich die Zellen als Pellet am Boden des Reaktionsgefäßes absetzten. Der Überstand wurde dekantiert, die Zellen mit 1ml Trizol (Ambion- life-technologies, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA,) gelöst und bei -80°C eingefroren.

HPMECs

Die Überstände wurden abgenommen, die Zellen mit 1ml Trizol (Ambion- life-technologies, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) pro Well lysiert und nach Überführung in 1,5ml Reaktionsgefäße bei -80°C eingefroren.

2.6. RNA Isolation aus Zellen

Die Extraktion der Ribonukleinsäure (RNA) aus den im Versuch verwendeten Zellen erfolgte mittels der Trizol Methode das in Trizol (Ambion- life-technologies, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) enthaltene Guanidiniumthiocyanat die Zellen lysiert und Enzyme wie RNAsen inaktiviert werden. Das ebenfalls enthaltene Phenol bewirkt eine Separierung von Proteinen und RNA/DNA.

Nachdem die in Trizol (Ambion- life-technologies,Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) eingefrorenen Zellen auf Eis aufgetaut waren, wurden pro 1ml Trizol (Ambion- life-technologies,Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA)

200µl Chloroform (AppliChem, Darmstadt, Deutschland) hinzugefügt und anschließend wurde die Lösung durch mehrmaliges kurzes Schütteln mittels Rotationsmixer gemischt. Auf eine 15 minütige Inkubationsphase auf Eis folgte eine Zentrifugation in einer Kühlzentrifuge (Centrifuge 5810R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) bei 12.000 x g, 4°C für 15 Minuten, wodurch sich drei Phasen separierten. In der unteren, organischen Phase, sind die Proteine gelöst, gefolgt von der weißlichen Interphase, in welcher sich die DNA befindet. In der oberen klaren Phase ist die RNA enthalten. Zur Präzipitation der RNA wurde die obere Phase vorsichtig abpipettiert, in ein frisches 1,5ml Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) überführt und mit 0,5ml Isopropanol (AppliChem, Darmstadt, Deutschland) versetzt. Dieses Gemisch wurde für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurde das Gemisch für 10 Minuten bei 12.000 x g, 4°C zentrifugiert, wobei sich am Boden des Reaktionsgefäßes ein aus RNA bestehendes Pellet absetzte. Zur Reinigung der RNA wurde der Überstand vorsichtig dekantiert, das Pellet mit 1ml 75% Ethanol (EtOH, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) versetzt und für 10 Minuten bei 12.000 x g zentrifugiert. Nach Wiederholung dieses Waschschrilles wurde das Ethanol verworfen, das Pellet luftgetrocknet und in 20-40µl mit Diethylpyrocarbonat-behandeltem Wasser (DEPC, AppliChem, Darmstadt, Deutschland) resuspendiert.

Die jeweilige RNA Konzentration und die Qualität der Probe wurde schließlich mittels UV-Spektralphotometrie (Nanodrop 2000, Peqlab, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) bestimmt. Da das Absorptionsmaximum der RNA bei 260nm (A260) und das von Proteinen bei 280nm (A280) liegt, wird der Quotient A260/A280 als Maß der Reinheit der isolierten RNA genutzt. Hierbei gilt für RNA ein Wert von 1,8 bis 2,0 als „rein“. Weiter wird der Quotient A260/A230 bestimmt, da bei einer Wellenlänge von 230nm das Absorptionsmaximum anderer möglicher Verunreinigungen, beispielsweise von Phenol liegt. Als „rein“ gilt eine Probe hier, wenn der Quotient A260/A230 in einem Bereich von 2.0 bis 2.2 liegt (Desjardins und Conklin, 2010).

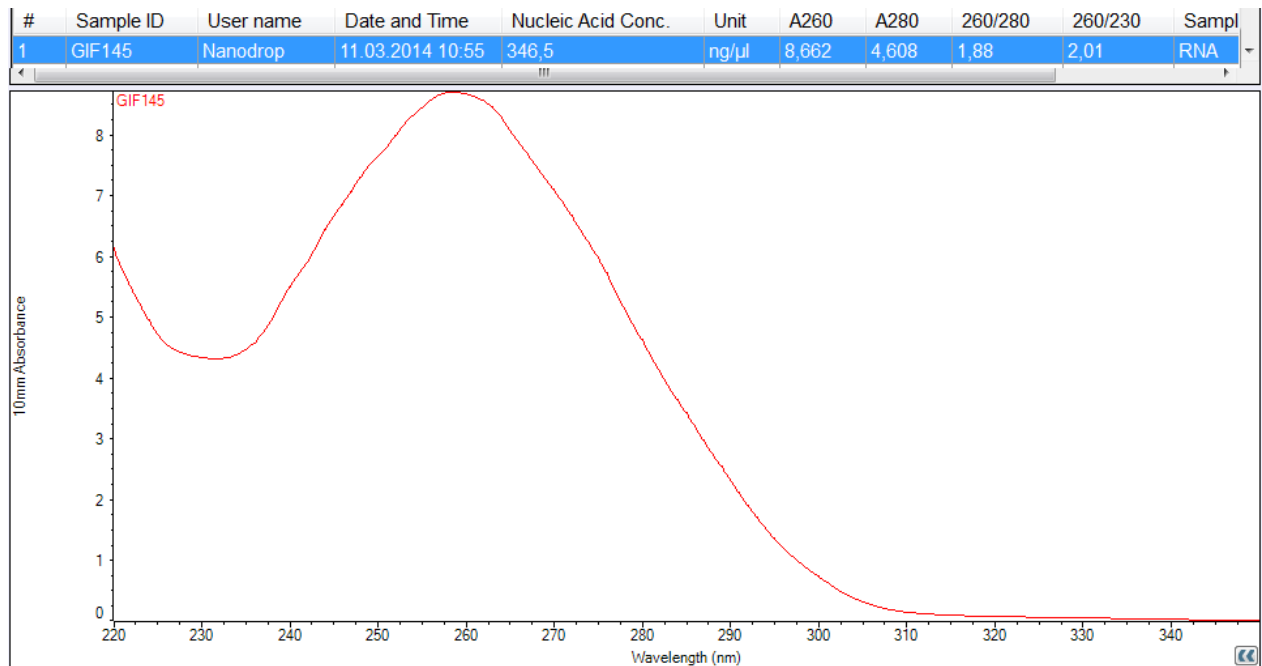


Abb.2. 4 Absorptionskurve RNA

Auf der x-Achse ist die Wellenlänge in nm dargestellt, auf der y-Achse die Absorption der Probe

2.6.1. RNA Isolation aus Rattenlebern

Die Extraktion der RNA aus Rattenlebern erfolgte wie bei der Extraktion aus Zellen mittels der Trizol Methode, allerdings musste das Gewebe vorher homogenisiert werden. Hierfür wurde zu den tiefgefrorenen Organstücken in ein 15ml Röhrchen 1ml Trizol pro 50-100mg Gewebe gegeben. Anschließend wurden die Organe für maximal 45 Sekunden mittels Homogenisator (Polytron PT2100, Kinematica, Luzern, Schweiz) zerkleinert, bis sich ein gleichmäßiges Gewebehomogenat gebildet hatte. Nach einer 5 minütigen Inkubationsphase bei Raumtemperatur wurden pro 1ml Trizol 200μl Chloroform hinzugegeben und nach einer nochmaligen kurzen Inkubation wurde diese Lösung bei 12.000 x g und 4°C für 15 Minuten zentrifugiert. Nach diesem Schritt folgte die Aufarbeitung nach der in 2.5.1. beschriebenen Methode.

2.6.2. cDNA Synthese

Da die gewonnene RNA nicht direkt als Template in einer PCR eingesetzt werden kann, muss sie mittels Reverser Transkription in complementary DNA (cDNA), eine zur RNA komplementären DNA, umgeschrieben werden (Jahnsen et al., 2007).

In einem ersten Schritt wurden hierfür pro Probe 2000ng RNA, gelöst in einem Gesamtvolumen von 25µl DEPC Wasser, mit 25µl eines Mastermixes (High capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) in einem 0,2ml RNase-freiem Reaktionsgefäß (Axygen, Corning, USA) gemischt. Der Mastermix setzt sich zusammen aus:

- Startermolekülen (10 x random Primers)
- Desoxyribonucleosidtriphosphate (25 x dNTPs; 100mM)
- Reverse Transkriptase Puffer (10x)
- Multiscribe reverse Transkriptase (50 U/µl)
- RNase Inhibitor (2000 U/µl)
- Nuklease freiem Wasser

Anschließend wurden die Proben in einen Thermocycler (T1 96, Biometra, Göttingen, Deutschland) gegeben, in dem das Temperaturprofil für die Reverse Transkription (RT) nach folgendem Schema automatisch abläuft.

- 25°C 10 Minuten
- 37°C 2 Stunden
- 85°C 5 sec.
- 4°C bis zur Entnahme der Proben

Während der Annealing Phase der RT hybridisieren die Primer an das 3'-OH-Ende des RNA Stranges. Die hierfür verwendeten Random Primer sind Oligonukleotide mit einer zufälligen Basensequenz und haben den Vorteil, dass sie an unterschiedlichen Stellen der RNA binden können (Feinberg und Vogelstein, 1983).

Im darauf folgenden Schritt katalysiert die RNA-abhängige DNA-Polymerase den Aufbau des cDNA Stranges mit Hilfe der dNTPs. Der verwendete Puffer dient der Stabilisierung des pH-Wertes, der RNase Inhibitor als Schutz der RNA vor möglicherweise in der Probe enthaltenden RNAsen.

2.6.3. Real Time PCR (q-PCR)

Nach der Synthese der cDNA wurde die spezifische cDNA Menge einzelner Zielgene mittels Real Time PCR (quantitative PCR, q-PCR) quantifiziert. Zum einen nutzten wir hierfür das Real-Time-PCR System ViiA7™ der Firma Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific (Massachusetts, USA) genutzt wurde, zum anderen das Real Time PCR System Quant Studio™, Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific (Massachusetts, USA).

Bei der q-PCR wird durch Messung der Fluoreszenz der inkorporierten Taq-Man™ Sonden nach den einzelnen PCR-Zyklen auf die zur Fluoreszenzintensität proportionalen Menge der Zielmoleküle geschlossen. In einem ersten Schritt wurde die durch reverse Transkription gewonnene cDNA 1:5 mit DEPC-Wasser verdünnt. Je 6,65µl dieser Verdünnung wurden mit 27µl eines Mastermixes, bestehend aus:

- Pufferlösung (2x Taq-Man™ universal Master Mix Buffer, TM uMM Buffer, Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA)
- Taq-Man™ Assay (Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA)
- DEPC Wasser

gemischt. Die mit dem Mastermix gemischten Proben wurden in Tripletts auf 384-Well-PCR Platten (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) pipettiert und anschließend mit Hilfe des ViiA7™ bzw. Quant Studio™, Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) analysiert. Die im Mastermix enthaltenden Taq-Man™ Assays enthalten für die gewünschte Zielsequenz spezifische Primer sowie eine ebenfalls spezifische, Fluoreszenz markierte Sonde.

In der initialen Denaturierungsphase wird die doppelsträngige cDNA in zwei Einzelstränge denaturiert.

In der folgenden Annealingphase binden zum einen die spezifischen Primer zum anderen die Sonde an die gewünschte Zielsequenz. Die Taq-Man™ Sonde besteht aus einem Reporter am 5'-OH-Ende und einem Quencher am 3'-OH-Ende. Solange beide verbunden sind, verhindert der Quencher, dass ein Signal gemessen werden kann, da er die Fluoreszenzemission des Reporters blockiert. Das ebenfalls im Assay

enthaltende Enzym Taq-DNA-Polymerase katalysiert den Vorgang der Zweitstrang Synthese und trennt gleichzeitig durch hydrolytische Spaltung Reporter und Quencher voneinander. Die nun vom Reporter ausgehende Fluoreszenzintensität kann gemessen werden. Je mehr Ausgangs-DNA in der Probe enthalten ist, desto mehr DNA-Stränge werden neu synthetisiert und desto höher ist die Fluoreszenzintensität, es liegt also ein proportionales Verhältnis von Fluoreszenzintensität zur Menge der Ausgangs-DNA vor (Jahson et al., 2007).

Der Grenzwert Crossing-Threshold (Ct) stellt die Anzahl an PCR-Zyklen dar, die für das Erreichen eines definierten Fluoreszenzniveaus benötigt wurden. Je mehr Ausgangs DNA vorhanden war, desto niedriger der Ct (Pfaffl, 2004). Um Varianzen im cDNA Gehalt, bedingt durch eventuelle Fehler in der vorangegangenen Aufarbeitung oder durch Schwankungen in der cDNA Synthese innerhalb der Proben auszugleichen, wird der Ct-Wert des Zielgens ins Verhältnis zum Ct-Wert eines nicht regulierten Housekeeping Gens (HKG) der gleichen Probe gesetzt (Pfaffl, 2004). Wir nutzten für alle Proben 18s als HKG und werteten die Daten mittels $\Delta\Delta\text{Ct}$ Methode nach folgender Formel aus:

$$\Delta\text{Ct} = \text{Ct Zielgen} - \text{Ct HKG}$$

$$\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct Behandlung} - \Delta\text{Ct Kontrolle}$$

$$\text{RQ} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$$

Der RQ Wert stellt somit den relativen Unterschied zwischen der Genexpression des Zielgens in der behandelten Probe zu der Genexpression des Zielgens in der Kontrollprobe dar (Pfaffl, 2004).

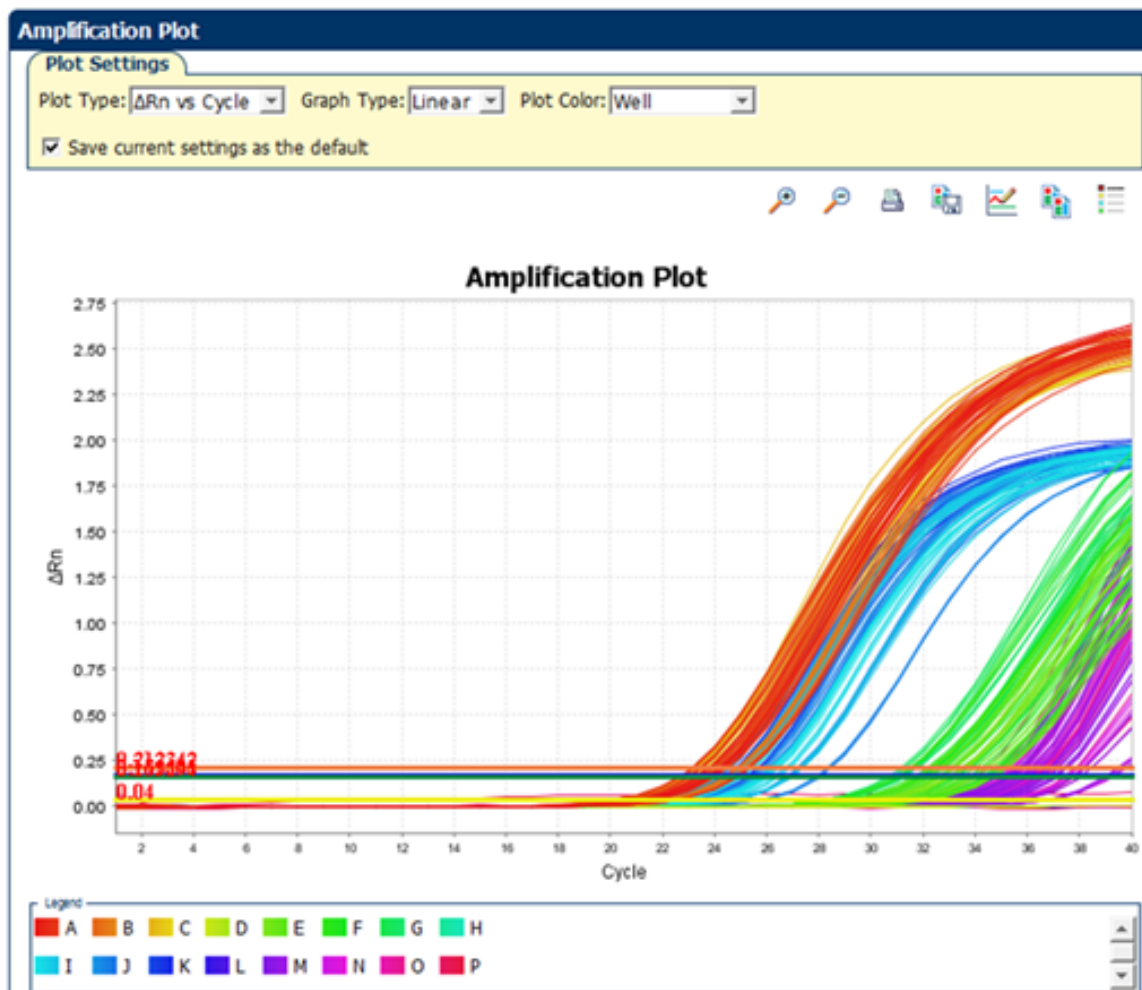


Abb.2. 5 Amplifikationskurve der q-PCR

Auf der X-Achse ist die Anzahl der PCR-Zyklen dargestellt, auf der Y-Achse die normalisierte Intensität des Reporterfarbstoffes (Rn). $\Delta Rn = (Rn \text{ Post-PCR}) - (Rn \text{ Prä-PCR})$.

Folgende Tabelle enthält die Taq-Man Sonden für die analysierten Zielgene (Taq-Man™ Assay, Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USAs):

Tabelle 2.1.

Zielgen	Taq-Man Sonde Human	Taq-Man Sonde Ratte
18s	Hs02387368_g1	Rn01428915_g1
Aldolase	Hs00605108_m1	Rn00820577_g1
Angiopoietin2	Hs00169867_m1	
EPO	Hs01071097_m1	Rn01481376_m1
Glut-1	Hs00892681_m1	
HIF-1a	Hs00153153_m1	Rn00577560_m1
HIF-2a		Rn00576515_m1
ICAM-1	Hs 00164932_m1	
IL-1β	Hs 01555410_m1	
IL-6	Hs 00985639_m1	
IL-8	Hs 00174103_m1	
PGK-1		Rn01474008_gh
TGF-β		Rn00572010_m1
VEGF	Hs00900055_m1	

Tab.2.1. Zielgene, welche mittels q-PCR gemessen wurden

2.7. Protein Nachweis

Die nukleäre Translokation von HIF-1 α wurde mittels Immunoblot und ELISA dargestellt, die Sekretion von verschiedenen Zytokinen und Chemokinen wurde durch Verwendung eines Proteom Profiler Arrays (Proteome Profiler™ Zytokine Human XL Cytokine Array Kit, R&D Systems) nachgewiesen und mittels ELISA quantifiziert.

Die Zellen wurden unter normoxischen Bedingungen (21%O₂) bzw. unter hypoxischen (1%O₂) Bedingungen bei 37°C inkubiert. Für die hypoxische Inkubation nutzten wir einen CO₂-Brutschrank (INC 153, Memmert, Schwabach, Deutschland), bei dem auch die O₂-Konzentration variiert werden kann bzw. eine Hypoxie Werkbank (Whitley H35, HEPA Hypoxystation, Don Whitley, Bingley, UK)

2.7.1. Zelllyse

HepG2 Zellen wurden auf Petrischalen mit 9 cm Durchmesser ausgesät und entsprechend der Fragestellung inkubiert. Am Ende des Experimentes wurden die Platten sofort auf Eis gesetzt, der Zellkulturüberstand abgenommen und der Zellrasen einmal mit PBS gewaschen. Nach dem restlosen Entfernen des PBS wurden die Zellen mit 200 μ l eiskaltem Radioimmunoprecipitation Assay Puffer (RIPA, bestehend aus 50mM TRIS-HCL pH 7.4, PanReac, AppliChem, Darmstadt, Deutschland, 1% NP-40, 0,25% Na-deoxycholate, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, 150mM NaCl, PanReac AppliChem, Darmstadt, Deutschland, 1mM EDTA, Sigma-Aldrich, St.Louis, USA) mit Protease-Inhibitor-Cocktail (Complete mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche, Basel, Schweiz) auf Eis lysiert. Das Zelllysate wurde in ein frisches, vorgekühltes 1,5ml Reaktionsgefäß überführt, 15 Sekunden auf dem Rotationsmixer gemischt und dann für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurden die Lysate nochmals gemischt und bei 16.000 x g in einer Tischzentrifuge (5415R, Eppendorf, Hamburg Deutschland) für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand, der das Gesamtzelllysate enthielt, wurde sorgfältig abgenommen, in ein frisches 1,5ml Reaktionsgefäß überführt und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.7.2. Western Blot

Die Bestimmung der gesamten Proteinmenge wurde mit dem kommerziell erhältlichen Pierce BCA (Bicinchoninacid) Protein Assay Kit (Pierce, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) durchgeführt. Bovines Serum Albumin (BSA) diente als Proteinstandard. Jeweils 5µl der verschiedenen Standardverdünnungen und der Proben wurden auf eine 96-Well Mikrotiterplatte aufgetragen, die BCA Reagenzien wurden entsprechend der Herstellerangaben dazu pipettiert und die Platte für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Platte in einem Plate Reader (Cytation³, BioTek Instruments, Vermont, USA) bei 590nm ausgelesen und die Proteinmenge der Proben anhand der Standardkurve bestimmt.

40µg Protein wurden mit 5x Proben-Puffer (6,24 ml 0,5 mol/l Tris Base pH 6,8, 1 g SDS, 5 ml Glycerin (87%), 50 mg Bromphenolblau, 10 % Mercaptoethanol) versetzt und zur Denaturierung der Proben 5 Minuten auf 95°C erhitzt. Anschließend wurden sie auf ein 5% Polyacrylamidgel bestehend aus 6,26ml H₂O, 1,25ml 30%Acrylamid (PanReac, AppliChem, Darmstadt, Deutschland), 2,5 ml 0,5M TRIS pH 6.8 (PanReac, AppliChem, Darmstadt, Deutschland), 100µl 10% Natriumlaurylsulfat (SDS, PanReac, AppliChem, Darmstadt, Deutschland), 100 µl 10% Ammoniumperoxodisulfat (APS, PanReac, AppliChem, Darmstadt, Deutschland) und 20µl Tetramethylethyldiamid (TEMED, PanReac, AppliChem, Darmstadt, Deutschland) aufgetragen und bei 120V, 60 Minuten elektrophoretisch aufgetrennt (Tetracell Elektrophorese-Einheit, BioRad Laboratories, Hercules, USA).

Nach der Elektrophorese wurden die Proteine aus dem Gel im Nassblotverfahren bei 100V, 60 Minuten auf eine Nitrocellulosemembran (Nitrocellulose Blotting Membrane, AmershamTMProtran, GE Healthcare, Chicago, USA) geblottet. Hierzu wurde das Transblot Modul der Firma BioRad Laboratories, Hercules, USA verwendet. Der vollständige Proteintransfer wurde durch Färbung der Nitrocellulosemembran mit Ponceau-Rot (Ponceau Solution, PanReac, AppliChem, Darmstadt, Deutschland) überprüft. Anschließend wurde die Membran für 60 Minuten in TBS-T Puffer mit 5% Magermilch (AppliChem, Darmstadt, Deutschland) inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen für Antikörper zu blockieren. Der TBS-T Puffer setzte sich wie folgt zusammen: 0,24% Tris Base (PanReac, AppliChem, Darmstadt, Deutschland), 0,875% Natrium Chlorid (PanReac AppliChem, Darmstadt, Deutschland), 0,1% Tween®20 (PanReac, AppliChem, Darmstadt, Deutschland) und Aqua dest..

Für die Detektion von HIF-1 α wurde die Membran über Nacht bei 4°C mit einem HIF-1 α spezifischen Antikörper (rabbit polyclonal anti-HIF-1 α , NB-100-479, Novus Biologicals, Wiesbaden, Deutschland) in einer Verdünnung von 1:1000 in TBS-T, 5% Magermilch inkubiert. Der Nachweis des gebundenen HIF-1 α Antikörpers erfolgte durch Inkubation mit einem Peroxidase-gekoppelten Anti-rabbit Antikörper (Cell Signaling Technology, Cambridge, UK; 1:10.000 in TBS-T, 5% Magermilch). Nach Zugabe des Chemilumineszenzsubstrat des Kits WesternBright™ Sirius™ (Advansta, San Jose, USA) und einminütiger Inkubation wurde die Membran im Chemilumineszenz Imager (Amersham™ Imager 300, GE Healthcare, Chicago, USA) für ca. 1 Minute belichtet.

Um die gleichmäßige Beladung der Gele und den Proteintransfer zu dokumentieren, wurden die Membranen anschließend mit einem Antikörper, der gegen β -Aktin (β -Actin (C4-HRP, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA) gerichtet ist (1:1000 in TBS-T, 5% Magermilch) für 2 Stunden inkubiert.

2.7.3. Enzym-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA)

Als ein sehr sensibler Immunoassay dient der Enzym-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA) zur Detektion und Quantifizierung von Proteinen (Lin, 2015). Bei der sogenannten Sandwich-ELISA Methode wird ein für das gesuchte Antigen spezifischer primärer Antikörper auf eine Platte aufgetragen. Anschließend folgen die Probe sowie ein zweiter primärer Antikörper, ebenfalls spezifisch für das gesuchte Protein. Die Probe ist nun wie in einem Sandwich an die beiden Antikörper gebunden. Anschließend wird ein Enzym-gekoppelter Sekundär Antikörper zugegeben und schließlich ein Substrat, welches einen enzymatischen Farbumschlag generiert, welcher später quantifiziert werden kann (Gan und Patel, 2013).

Zur Quantifizierung der von uns gewählten Proteine nutzten wir DuoSet® ELISA Kits der Firma R&D Systems (Minneapolis, USA). Das gesamte Verfahren wurde bei Raumtemperatur durchgeführt. Im ersten Schritt wurde eine 96-Well Mikrotiterplatte (Greiner Bio One, Kremsmünster, Österreich) mit einem spezifischen Capture Antikörper beschichtet. Hierzu wurden 100 μ l des im Kit enthaltenden Capture Antikörpers, nach Herstellerangaben mit PBS verdünnt, pro Well aufgetragen und

über Nacht inkubiert. Um nicht gebundene Antikörper zu entfernen, wurde jedes Well in einem Waschgerät für Mikrotiterplatten (405 Touch Washer, BioTek Instruments, Vermont, USA) 5 x mit einem Waschpuffer, bestehend aus 0,05 % Tween® 20 in PBS pH7,4 gewaschen. Dieser Waschschrift wurde nachfolgend zwischen allen Inkubationen durchgeführt. Zum Blockieren nicht spezifischer Protein Bindungsstellen, wurde in jedes Well 300µl Reagent Diluent (RD), bestehend aus 1% Bovinem Serum Albumin (BSA, AppliChem, Darmstadt, Deutschland) in PBS, pipettiert und eine Stunde inkubiert. Nachfolgend wurden eine spezifische Proteinstandardreihe sowie die Proben auf die Platte aufgetragen (je 100µl/Well) und für 2 Stunden auf der Platte belassen. Anschließend wurden pro Well 100µl eines mit RD verdünnten Detection Antikörpers hinzugegeben, wieder wurde 2 Stunden inkubiert. Im nächsten Schritt wurde jedes Well für 20 Minuten mit 100µl HRP-Streptavidin, an Horse-Radish-Peroxidase konjugiertes Streptavidin, inkubiert. Nach einem letzten Waschschrift wurden zur Markierung der Antigen-Antikörper Komplexe 100µl Substrat Solution (OptEIA, BD, San Jose, USA) pro Well zugegeben und bei Dunkelheit für 20 Minuten auf der Platte belassen. Vor der Messung der optischen Dichte im Plate Reader (Cytation³, BioTek Instruments, Vermont, USA) wurde die Reaktion mit 50µl Schwefelsäure (1mol/l, AppliChem, Darmstadt, Deutschland) pro Well gestoppt.

2.7.4. Proteome Profiler™

Mit Hilfe des Proteome Profilers™ ist es möglich, eine breite semi-quantitative Analyse der von Zellen unter bestimmten experimentellen Bedingungen sezernierten Proteine durchzuführen. Wir benutzten für diesen Zweck das Proteome Profiler™ Human XL Cytokine Array Kit der Firma R&D Systems (R&D Systems, Minneapolis, USA). Bei diesem Kit sind auf eine Nitrocellulosemembran 104 verschiedene Antikörper gegen bestimmte Zytokine aufgespottet. Dadurch ist eine zeitgleiche Detektion dieser Zytokine möglich. Die nachweisbaren Proteine sowie die Lokalisation der einzelnen Proteine auf der Membran sind in Tabelle 8.1 im Anhang zusammengefasst (siehe Anhang).

Alle Proben und Reagenzien wurden gemäß Herstellerangaben vorbereitet. Die Membranen wurden zusammen mit 2ml eines Blockierungspuffers in je ein Fach

einer 4-Well Platte gelegt und auf einem Plattformschüttler für eine Stunde inkubiert. Anschließend wurde der Puffer abpipettiert, die jeweiligen Proben auf die Membranen aufgetragen und über Nacht im Kühlschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Membranen aus der 4-Well Platte entfernt, mit 20ml eines Waschpuffers in einzelne Waschgefäße überführt und für 20 Minuten auf einem Plattformschüttler gewaschen. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt, anschließend wurden 30µl des Detektionsantikörpers mit 1,5ml eines 1 x Array Puffers gemischt. Je 1,5ml dieser Mischung wurden in jedes der 4 Fächer der gereinigten 4-Well Platte gegeben. Die Membranen wurden ebenfalls wieder auf die 4-Well Platte überführt und für eine Stunde auf dem Plattformschüttler inkubiert, worauf erneute Waschschriffe, wie oben beschrieben, folgten. Nun wurden die Membranen mit 2ml Streptavidin-HRP (über 30 Minuten in der 4 Well Platte inkubiert, erneut folgten 3 Waschschriffe. Im Anschluss wurden die Membranen mit Chemi Reagent Mix, bestehend aus Luminol und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) benetzt. Nach einminütiger Inkubation wurde das Bild im Chemilumineszenz Imager (Amersham™ Imager 300, GE Healthcare, Chicago, USA) für ca. 5 Minuten belichtet. Die Quantifizierung erfolgte mittels Messung der Farbintensität pro Pixel.

2.8. Statistische Methoden

Für die statistische Auswertung der Daten wurde das Programm GraphPad PRISM®, Version 5.02 für Windows verwendet.

Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben. Statistische Vergleiche der verschiedenen Behandlungsgruppen erfolgten mittels einfaktorieller Varianzanalyse (one-way ANOVA, analysis of variance). Zur weiteren Untersuchung der signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen wurden als post-hoc Tests bei Varianzinhomogenität der Dunnet's Test verwendet, bei Varianzhomogenität der Tuckey Test.

Bei der Auswertung der Versuche mit humanem EK Überstand fielen zum Teil hohe Varianzen zwischen den Blutspendern auf. Zeigten sich keine spenderspezifischen signifikanten Unterschiede in den Ergebnissen, wurden die Ergebnisse der einzelnen Blutspender zusammengefasst. Konnten wir jedoch signifikante Unterschiede beobachten, wurden die Spender einzeln dargestellt.

3. Resultate

3.1. *In-vivo* Modell

Der operative Eingriff einer Leberteilresektion ist meist mit einem erheblichen Blutverlust für den Patienten verbunden, welcher in sehr vielen Fällen eine Bluttransfusion nötig macht.

Da der Prozess der Leberregeneration ein sehr sensibler Prozess ist, versuchten unsere israelischen Kooperationspartner in einem *in-vivo* Modell an Ratten herauszufinden, ob der intraoperative Blutverlust bzw. die Transfusion von frischen oder alten EKs Einfluss auf diesen Prozess nehmen.

Alle Experimente wurden nach den Richtlinien des „Animal Care and Use Committee of the hebrew University“ durchgeführt. Die Ratten wurden mit 100mg/kg Ketamin und 5 mg/kg Xylazin intraperitoneal (i.p.) anästhesiert und atmeten spontan.

Die PHx erfolgte nach der Methode von Higgins und Anderson, nach der der Mittel- sowie der linke laterale Leberlappen entfernt wurden (Higgins und Anderson, 1931; Matot et al., 2017). Für die Versuche wurden männliche, mit 6-8 Wochen ausgewachsene (340-380g) Sprague-Dawley Ratten verwendet.

3.1.1. Einfluss von PHx, Blutverlust und Transfusion mit frischen oder alten EKs auf die Proliferation von Hepatozyten

Bromdesoxyuridin (BrdU) kann während der Zellteilung als Analogon des Nukleosides Desoxythymidin in die DNA eingebaut werden. Mittels eines fluoreszenzmarkierten Antikörpers können die Zellen, welche BrdU als DNA Baustein gebraucht haben, immunhistochemisch sichtbar gemacht werden. Damit ist BrdU ein Marker für die Proliferation von Zellen (Wojtowicz und Kee, 2006).

Diesen Marker nutzen unsere Kooperationspartner aus Israel, um den Einfluss einer PHx sowie einer PHx mit zusätzlich herbeigeführtem Blutverlust auf die Proliferation von Leberzellen zu untersuchen. Es wurden zwei Gruppen von Ratten, à 6-8 Tiere, gebildet, welche wie oben beschrieben operiert wurden. An den postoperativen Tagen (POT) 1, 2, 4 und 7 wurde den Ratten jeweils 3 Stunden vor Beendigung des Versuches 100mg/kg BrdU intraperitoneal (i.p.) gespritzt. Die entnommenen Lebern wurden nach Fixierung in Formalin in Paraffin eingebettet, anschließend wurden ca.

2µm dicke Schnitte angefertigt und die BrdU positiven Zellen mittels BrdU Assay sichtbar gemacht und händisch unter dem Mikroskop ausgezählt.

Die histologischen Schnitte der Tiere, welche nur teilhepatektomiert worden waren, wiesen eine höhere Anzahl BrdU positiver Zellen und damit eine höhere Proliferationsrate der Hepatozyten auf, als die der Tiere, denen zusätzlich Blut entnommen worden war. Der Proliferationspeak der Leberzellen der PHx Tiere war am ersten postoperativen Tag (POT1) zu beobachten, der der Tiere, welche einen zusätzlichen Blutverlust erlitten hatten erst an POT 2 (Abb. 3.1).

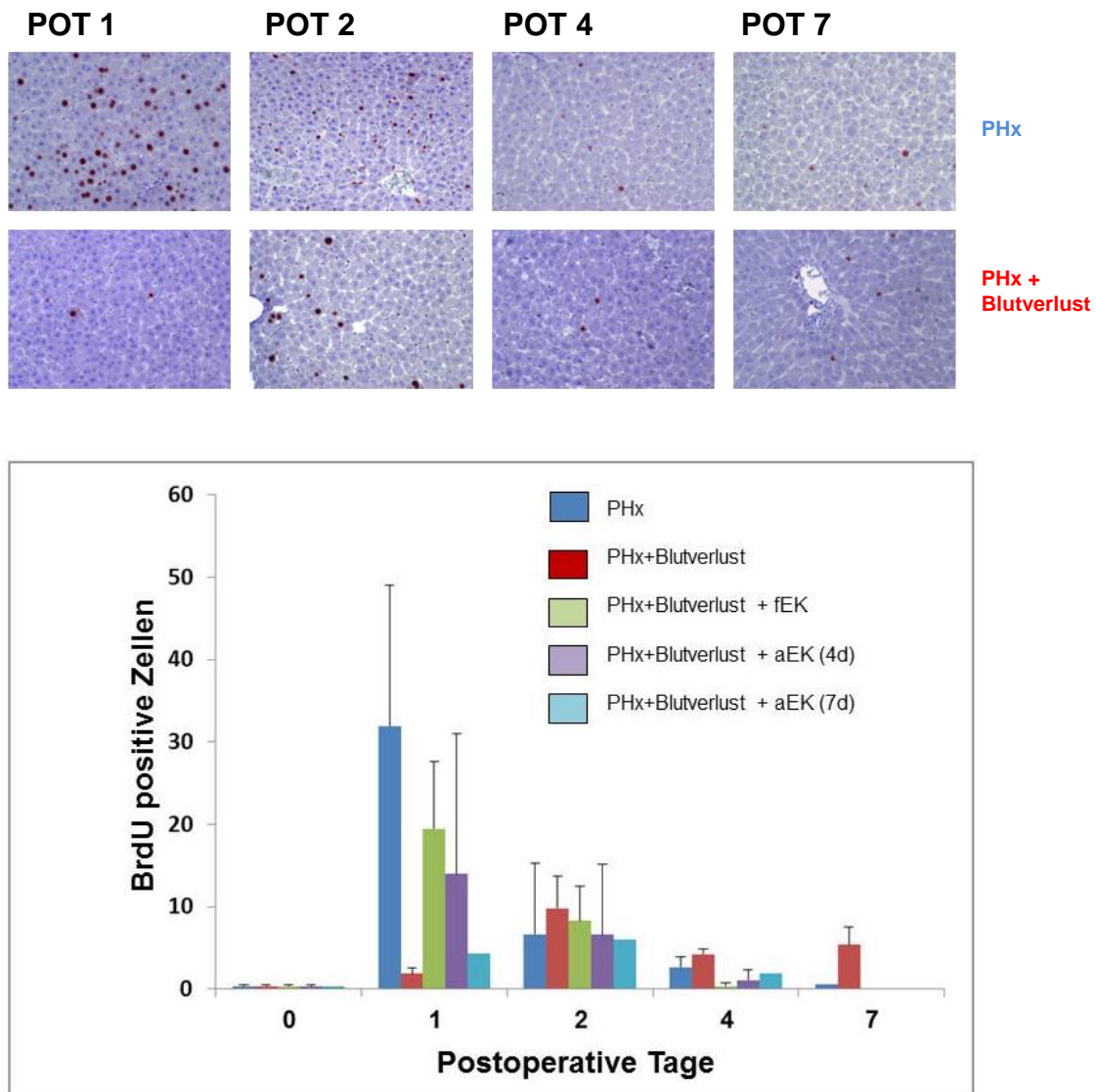


Abb.3. 1 Proliferation von Hepatozyten nach partieller Hepatektomie, partieller Hepatektomie mit zusätzlich herbeigeführtem Blutverlust und partieller Hepatektomie mit zusätzlich herbeigeführtem Blutverlust und Ausgleich durch frische oder alte EKs

Diese Experimente wurden von den israelischen Kooperationspartnern durchgeführt. Sprague-Dawley Ratten wurden partiell hepatektomiert, bei einer zweiten Gruppe wurden zusätzlich 3ml Blut entnommen.

3 Stunden vor Beendigung des Versuchs erhielten die Ratten 100mg/kg KGW Bromodeoxyuridine (BrdU). Die BrdU-Immunfärbung wurde zum Nachweis der Zellproliferation an den POT 1, 2, 4 und 7 durchgeführt.

n = 6-8 Tiere/Gruppe.

3.1.2. Einfluss von PHx, Blutverlust und Transfusion mit frischen oder alten EKs auf die Oxygenierung des Lebergewebes

Der Einfluss von PHx, Blutverlust und einer Transfusion von frischen bzw. alten EKs auf die Oxygenierung des Lebergewebes wurde mittels Pimonidazol (PIM) Färbung ermittelt. Pimonidazol gilt als zellulärer Hypoxiemarker, welcher bei einem Sauerstoffpartialdruck (PO_2) $< 10\text{mmHg}$ reduziert wird und dann mittels spezieller Antikörper immunhistochemisch sichtbar gemacht werden kann (Arteel et al., 1995). Es wurden vier verschiedene Gruppen gebildet.

PHx Gruppe: Tieren aus dieser Gruppe wurde operativ ca. 50% des Lebergewebes entfernt.

Blutverlust Gruppe: Tieren aus dieser Gruppe wurde operativ ca. 50% des Lebergewebes entfernt, zusätzlich wurde den Tieren ein weiterer Blutverlust von 3ml zugeführt. Dieser wurde durch eine Punktion beider Femoralvenen und einer Blutentnahme von 1ml Blut pro Minute herbeigeführt.

FrISCHE EK (fEK) Gruppe: Tieren aus dieser Gruppe wurde 10 Minuten nach der PHx und dem zusätzlich herbeigeführten Blutverlust 3ml *frISCHE*, also am selben Tag gewonnene, EKs über Venenzugänge in beiden Femoralvenen infundiert (3ml, 1ml/min).

Alte EK (aEK) Gruppe: Tieren aus dieser Gruppe wurde 10 Minuten nach der PHx und dem zusätzlich herbeigeführten Blutverlust 7 Tage *alte* EKs (entsprechen 40 Tage gelagerten humanen EKs) über Venenzugänge in beiden Femoralvenen infundiert (3ml, 1ml/min).

Die Tiere wurden wie oben beschrieben operiert, anschließend wurde Ihnen 60 Minuten vor Beendigung des Experiments intraperitoneal 60mg/kg Pimonidazol injiziert. Nach der Organentnahme wurde das Lebergewebe in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet, anschließend wurden 2µm dicke Schnitte angefertigt. Diese wurden mittels Hämatoxylin & Eosin (h&e) Färbung gefärbt und mit anti-PIM Antikörpern inkubiert.

10 zufällig ausgewählte Areale auf den Schnitten wurden verblindet ausgewertet. Hypoxische Areale stellen sich rot gefärbt dar.

Gewebsschnitte von Tieren aus der PHx - sowie aus der fEK Gruppe zeigten kaum hypoxische Areale.

Schnitte von Tieren aus der Blutverlust Gruppe wiesen deutliche hypoxische Bezirke, vor allem im Bereich der Zentralvene auf.

Bei den Gewebsschnitten der Ratten aus der aEK Gruppe stellte sich das Gewebe insgesamt rötlich gefärbt und damit hypoxisch dar, ebenfalls war dies besonders intensiv im Bereich der Zentralvenen zu beobachten (Abb. 3.2.).

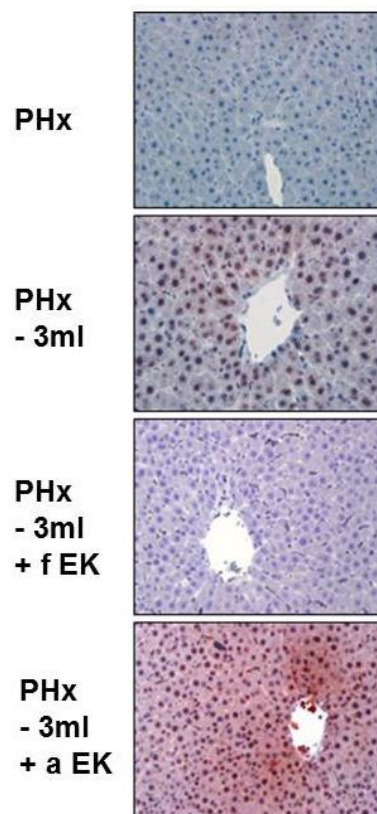


Abb.3. 2 Nachweis hypoxischer Areale im Lebergewebe der Ratte nach partieller Hepatektomie, und Transfusion von frischen (fEK) oder alten (aEK) Erythrozytenkonzentraten.

Hypoxische Areale im Lebergewebe wurden in Kooperation mit Dr. Rinat Abramovitch (Jerusalem) nachgewiesen. Eine Stunde vor Ende des Experimentes wurde den Ratten 60mg/kg, Pimonidazol intraperitoneal gespritzt. (PIM, Hypoxyprobe, HPI, Burlington, MA, USA). Das Lebergewebe wurde fixiert, in Paraffin eingebettet und geschnitten (2µm Schnittdicke). Die Schnitte wurden anschließend mit anti-PIM (1:1000 Hypoxyprobe; Natural Pharmacia International, Belmont, MA, USA) inkubiert.

Da sowohl mittels fMRI als auch mittels Pimonidazol-Färbung gezeigt werden konnte, dass die Leberzell-Oxygenierung durch eine PHx und eine Substitution mit unterschiedlich altem Blut beeinflusst wird, bestimmten wir als nächstes mittels q-PCR die Expression unterschiedlicher Hypoxie-induzierter Gene, um einen genaueren Einblick in die molekularbiologischen Prozesse in den operierten Geweben zu erhalten. Hierfür wurden nach den von unseren israelischen Kooperationspartnern durchgeführten Experimenten die Lebern der operierten Ratten entnommen, eingefroren und auf Trockeneis gelagert in unser Labor geschickt.

HIF-1 α kommt ubiquitär im Körper vor und spielt eine Schlüsselrolle in der Anpassung der Zellen an hypoxische Bedingungen (Schmidt et al., 2007). Tajima et al. beschrieben 2009 in einer Studie, dass HIF-1 α während der Regeneration von Lebergewebe eine wichtige Funktion für die Stabilisierung des hepatischen Glukosemetabolismus spielt (Tajima et al., 2009).

HIF-2 α kommt im Gegensatz zu HIF-1 α nur in bestimmten Zellen des Körpers wie beispielsweise Endothelzellen, Hepatozyten, Kardiomyozyten oder Gliazellen vor (Franke et al., 2013). Während die HIF-1 α Expression vor allem in akuten hypoxischen Zuständen hochreguliert wird, erhöht sich die Expression von HIF-2 α , wenn der Körper über einen längeren Zeitraum geringeren Sauerstoffpartialdrücken ausgesetzt ist (van Patot und Gassmann, 2011).

Neben gemeinsamen Zielgenen von HIF-1 und HIF-2, wie zum Beispiel GLUT-1 und VEGF, haben beide auch „eigene“ Zielgene. Dies sind beispielsweise LDHA (Lactatdehydrogenase A) und PGK-1 (Phosphoglyzeratkinase 1) von HIF-1 α oder MMP9 (Matrix Metalloproteinase 9) von HIF-2.

Bei Tieren, denen neben einer PHx zusätzlich Blut entnommen worden war, stieg sowohl die Expression von HIF-1 α als auch die von HIF-2 α signifikant an. Die Werte zeigten einen Peak am POT 4.

Die HIF-1 α und HIF-2 α Expression der Tiere der anderen Gruppen änderte sich im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht signifikant (Abb.3.3).

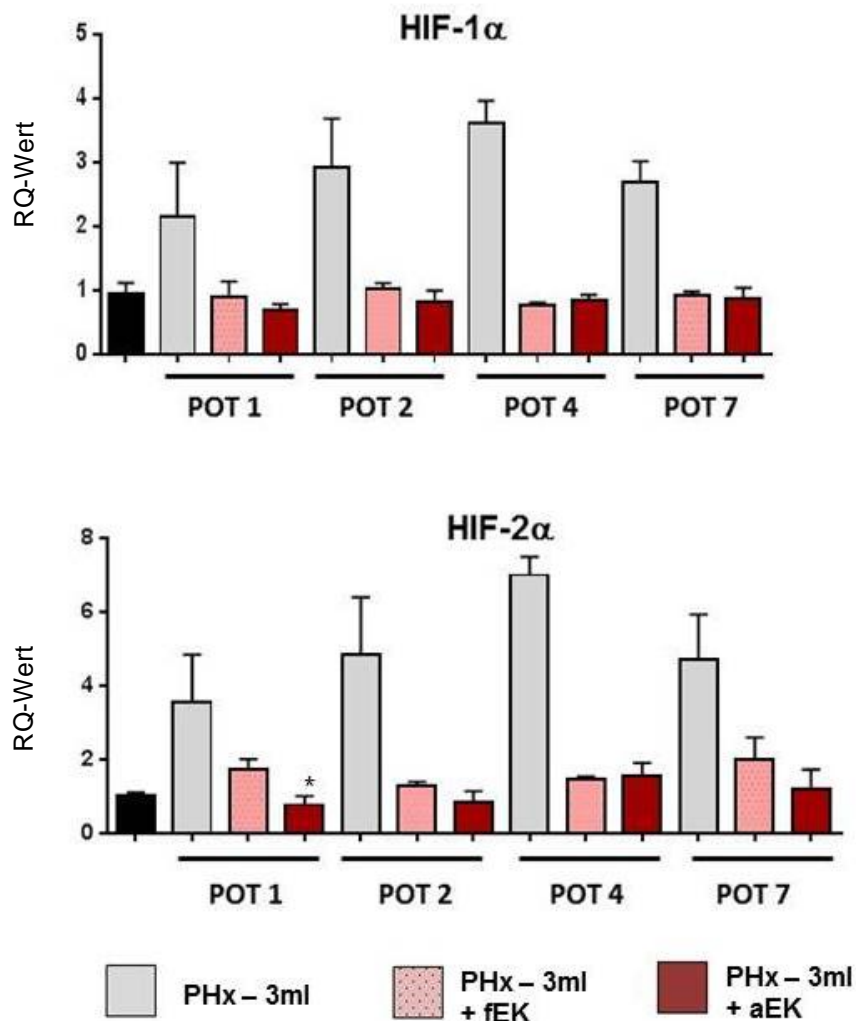


Abb.3. 3 Induktion der Expression von HIF-1a und HIF-2a mRNA im Lebergewebe von Ratten nach PHx und re-transfusion von frischen (fEK) oder alten Erythrozyten (aEK).

Diese Experimente wurden von den israelischen Kooperationspartnern durchgeführt. Sprague-Dawley Ratten wurden partiell hepatektomiert, es wurden 3 ml Blut entnommen und anschließend 3 ml frisches oder altes Blut re-transfundierte.

An den postoperativen Tagen (POT) 1, 2, 4 und 7 wurden die Tiere getötet, die Leber entnommen, die Gesamt-RNA extrahiert und die Expression der Transkriptionsfaktoren HIF-1a und HIF-2a mittels q-PCR wie unter 2.5. beschrieben quantifiziert. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichung, * $p < 0,05$ fEK vs. aEK, $n=16$ (1-way ANOVA; Post Test: Tukey's Multiple Comparison Test.)

PGK1 und Aldolase sind glykolytische Enzyme, welche HIF induziert sind. Sie wirken maßgeblich im Prozess der Anpassung an die Energiegewinnung unter hypoxischen Bedingungen mit.

Bei der Blutverlust-Gruppe war eine signifikante Erhöhung sowohl der PGK1- als auch der Aldolase-Expression zu beobachten. Die PGK1 Expression erreichte an POT 2 einen Peak, die Aldolase Expression an POT4. In den verbleibenden Gruppen änderte sich weder die PGK1 noch die Aldolase Expression signifikant (Abb.3.4).

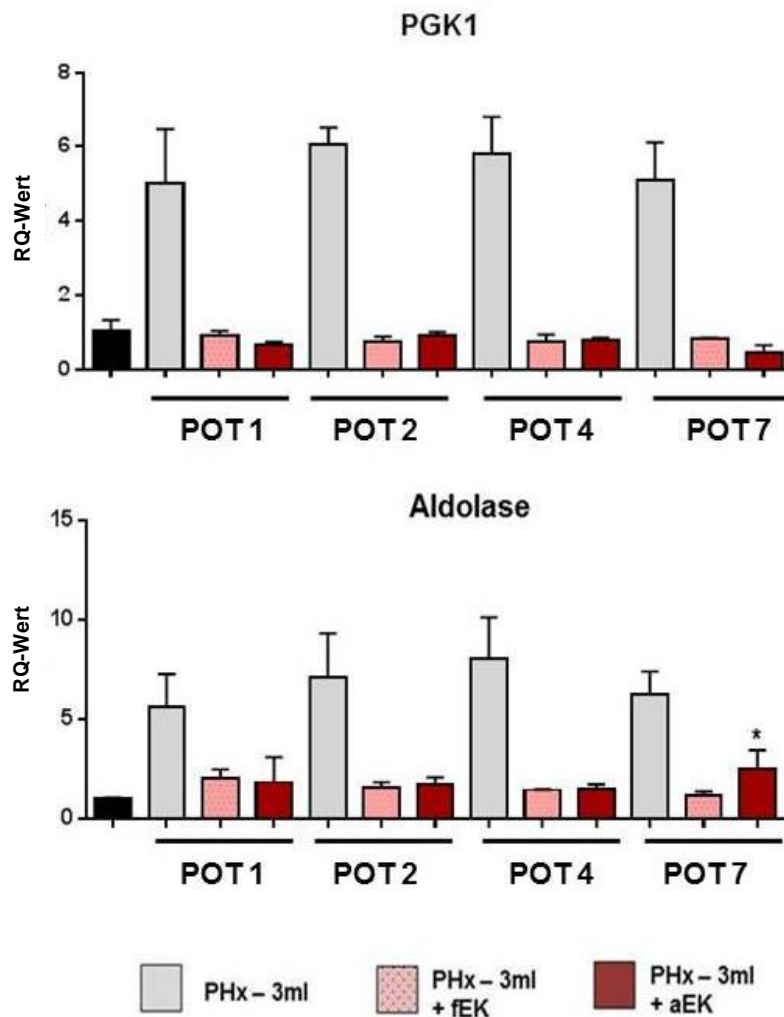


Abb.3. 4 Induktion der Expression von PGK1 und Aldolase mRNA im Lebergewebe von Ratten nach PHx und Retransfusion von frischen (fEK) oder alten Erythrozyten (aEK).

Diese Experimente wurden von den israelischen Kooperationspartnern durchgeführt. Sprague-Dawley Ratten wurden partiell hepatektomiert, es wurden 3ml Blut entnommen und anschließend 3ml frisches oder altes Blut retransfundiert.

An den postoperativen Tagen (= POT) 1, 2, 4 und 7 wurden die Tiere getötet, die Leber entnommen, die Gesamt-RNA extrahiert und die Expression von PGK-1 und Aldolase mittels q-PCR wie unter 2.5. beschrieben quantifiziert. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichung, * $p < 0,05$ fEK vs. aEK, $n=16$ (1-way ANOVA; Post Test: Tukey's Multiple Comparison Test.)

Da Erythropoietin durch eine Anregung der Erythropoiese zu einer deutlichen Verbesserung der Gewebsoxygenierung beiträgt (Erslev und Gabuzda, 1985), steigt die EPO Konzentration im Plasma und im Gewebe unter hypoxischen Bedingungen gravierend an (Jelkmann, 1992). Als Indikator für Anpassungsvorgänge der Zellen an eventuelle hypoxische Bedingungen, verursacht durch PHx, zusätzliche Blutung oder Retransfusion von alten oder frischen EKs, bestimmten wir mittels q-PCR die EPO Expression in der Leber der operierten Ratten.

Die EPO Expression stieg bei Tieren der Blutverlust Gruppe signifikant bis POT 4 an, danach fiel sie, war aber an POT 7 immer noch signifikant höher als in den restlichen Gruppen. Tiere aus der fEK - sowie aus der aEK Gruppe exprimierten nur geringgradig mehr EPO als die Kontrollgruppe. Allerdings zeigte sich in der aEK Gruppe an POT2 ein signifikant höherer Wert der EPO Expression.

Transforming growth factor beta (TGF- β) ist ein multifunktionales Zytokin, welches unter anderem Zellwachstum, – differenzierung und die Funktion von verschiedenen epithelialen sowie mesenchymalen Zellen beeinflusst (Roberts et al., 1990). Im Prozess der Leberregeneration hemmt TGF- β die Proliferation der Hepatozyten (Russell et al., 1988).

Die TGF- β Expression änderte sich bei Tieren der Blutverlust Gruppe signifikant. Hier war die Expression deutlich erhöht, der RQ Wert erreichte an POT 4 einen Peak. Die TGF- β Expression der Zellen der übrigen Behandlungsgruppen änderte sich nicht signifikant (Abb.3.5.).

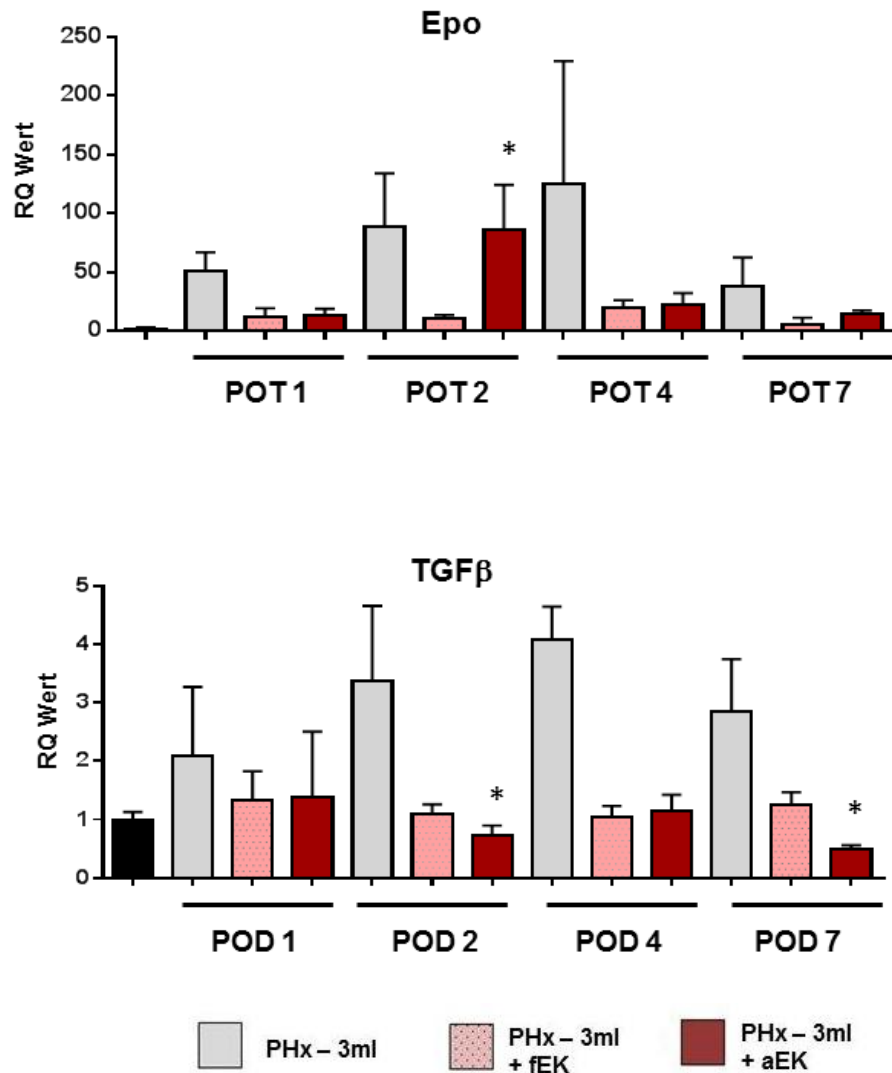


Abb.3. 5 Induktion der Expression von EPO und TGF-β mRNA im Lebergewebe von Ratten nach PHx und Retransfusion von frischen (fEK) oder alten Erythrozyten (aEK).

Diese Experimente wurden von den israelischen Kooperationspartnern durchgeführt. Sprague-Dawley Ratten wurden partiell hepatektomiert, es wurden 3ml Blut entnommen und anschließend 3ml frisches oder altes Blut retransfundiert.

An den postoperativen Tagen (= POT) 1, 2, 4 und 7 wurden die Tiere getötet, die Leber entnommen, die Gesamt-RNA extrahiert und die Expression von EPO und TGF-β mittels q-PCR wie unter 2.5. beschrieben quantifiziert. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichung, * $p < 0,05$ fEK vs. aEK, $n=16$ (1-way ANOVA; Post Test: Tukey's Multiple Comparison Test.)

3.1.2. Einfluss von PHx, Blutverlust und Transfusion von fEK, aEK und HAES auf Makrophagen

Um den Einfluss von PHx, einer zusätzlichen Blutung und einer Retransfusion mit frischen oder alten EKs sowie des als Volumenersatz genutzten Plasmaexpanders Hydroxyethylstärke (HAES) auf die Makrophagen Präsenz im Lebergewebe zu untersuchen, wurden 5 unterschiedliche Versuchsgruppen gebildet.

Nach der Operation wurden die Tiere nach 1, 2, 3, 4 oder 7 Tagen schmerzfrei getötet, die Lebern wurden entfernt und Immunhistochemisch gefärbt. Hierbei wurde ein gegen das Membranantigen CD 163 gerichteter Antikörper (ED2) als Marker für eine Makrophagenansammlung im Gewebe verwendet.

Das Membranantigen CD 163 (Cluster of Differentiation 163) ist spezifisch für residente Makrophagen (Fabriek et al., 2007).

Die unterschiedlichen Gruppen wurden nach folgendem Schema eingeteilt:

PHx Gruppe: Tieren aus dieser Gruppe wurde operativ ca. 50% des Lebergewebes entfernt.

Blutverlust Gruppe: Tieren aus dieser Gruppe wurde operativ ca. 50% des Lebergewebes entfernt, zusätzlich wurde den Tieren ein weiterer Blutverlust von 3ml zugeführt. Dieser wurde durch eine Punktion beider Femoralvenen und einer Blutentnahme von 1ml Blut pro Minute herbeigeführt.

Frische EK (fEK) Gruppe: Tieren aus dieser Gruppe wurde 10 Minuten nach der PHx und dem zusätzlich herbeigeführten Blutverlust 3ml *frische* EKs über Venenzugänge in beiden Femoralvenen infundiert (3ml, 1ml/min).

Alte EK (aEK) Gruppe: Tieren aus dieser Gruppe wurde 10 Minuten nach der PHx und dem zusätzlich herbeigeführten Blutverlust 7 Tage *alte* EKs (entsprechen 40 Tage gelagerten humanen EKs) über Venenzugänge in beiden Femoralvenen infundiert (3ml, 1ml/min).

HAES Gruppe: Tieren aus dieser Gruppe wurde 10 Minuten nach der PHx und dem zusätzlich herbeigeführten Blutverlust HAES über Venenzugänge in beiden Femoralvenen infundiert (3ml, 1ml/min).

Eine alleinige PHx führte zu einem Anstieg der ED2 positiven Zellen im Lebergewebe, welcher an POT 4 seinen Peak erreichte.

Eine zusätzliche Blutung führte zu einem früheren, aber niedrigeren Peak an POT 1, gefolgt von einem Absinken der ED2 positiven Zellen. Diese stiegen danach jedoch bis POT 7 wieder an.

Dieser Effekt wurde durch die Gabe von frischen EKs ausgeglichen, es zeigte sich bei dieser Gruppe ein sehr ähnliches Bild zur reinen PHx Gruppe.

Bei Tieren, denen als Ausgleich der Blutung alte EKs transfundiert wurden, zeigte sich im Vergleich zu den anderen Gruppen eine signifikante Erhöhung der ED2 positiven Zellen an POT 2, gefolgt von einem Absinken bis POT 4.

Auch in der HAES Gruppe war der Peak an POT 1 zu beobachten, gefolgt von einer stetigen Abnahme der ED2 positiven Zellen (Abb.3.6).

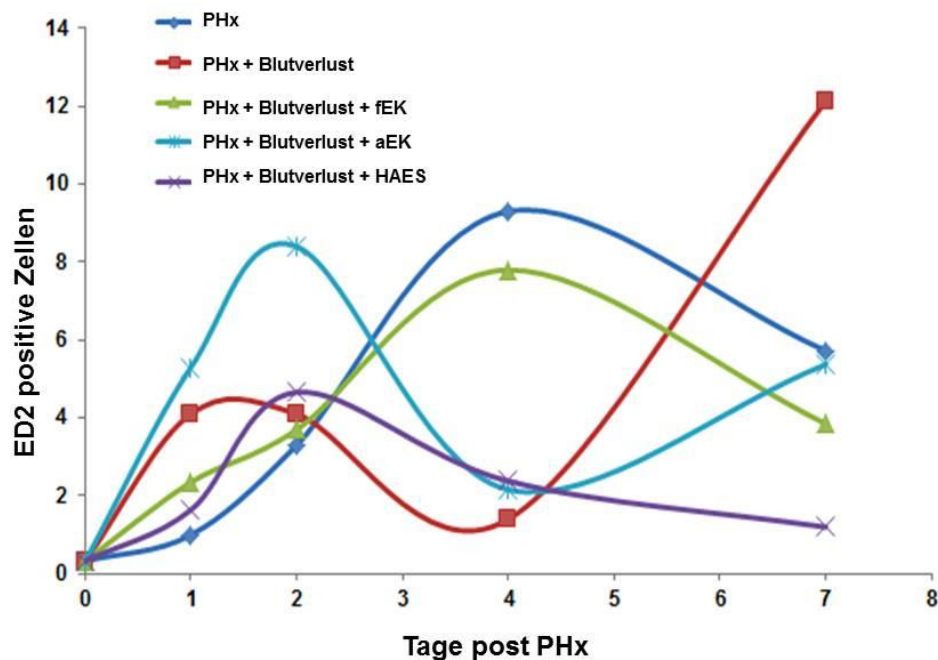
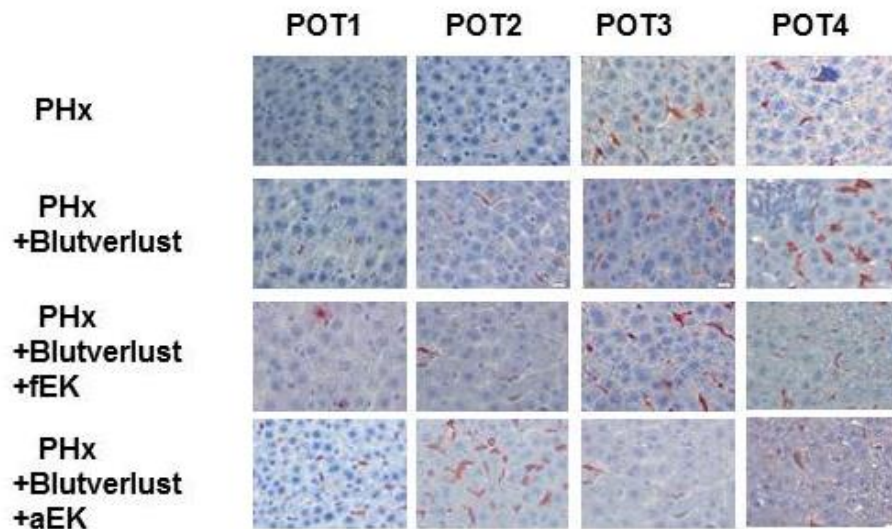


Abb.3. 6 Makrophagen Präsenz im Lebergewebe nach PHx, Blutverlust und Transfusion von fEKs, aEKs oder HAES

Diese Experimente wurden von den israelischen Kooperationspartnern durchgeführt. Sprague-Dawley Ratten wurden partiell hepatektomiert, je nach Gruppe wurden zusätzlich 3ml Blut entnommen und anschließend 3ml frisches oder altes Blut oder HAES retransfundiert.

An den postoperativen Tagen (= POT) 1, 2, 3, 4 und 7 wurden die Tiere getötet, die Leber entnommen und Immunhistochemisch zur Überprüfung der Makrophagen Präsenz gefärbt.

n= 6 / Zeitpunkt / Gruppe

3.2. Humanes *in-vitro* Modell

3.2.1. Altersabhängige Veränderungen von EKs

Vom Institut für experimentelle Hämatologie und Transfusionsmedizin, Uniklinik Bonn, wurden uns humane Erythrozytenkonzentrate der Blutgruppe 0 Rh+ 2 Tage nach Abnahme zur Verfügung gestellt. Wir lagerten sie bei 4°C und entnahmen 2, 21 und 42 Tage nach Entnahme Proben und gewannen wie unter 2.2. beschrieben den EK Überstand.

Im optischen Nachweis war mit längerer Lagerungsdauer eine deutliche Zunahme des freien Hämoglobins durch eine damit verbundene verstärkte Rotfärbung des Überstandes der EKs zu erkennen (Abb.3.7).

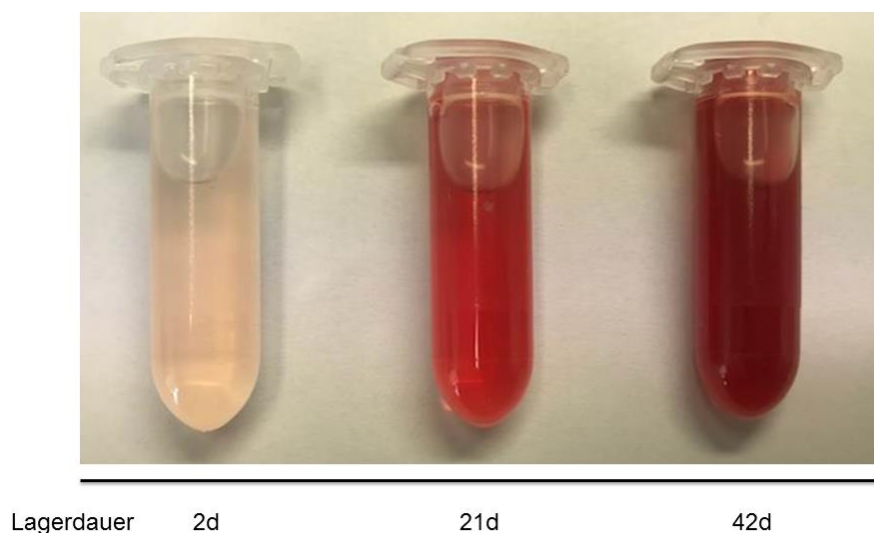


Abb.3. 7 Optischer Nachweis der Zunahme von freiem Hämoglobin im Überstand von unterschiedlich lang gelagerten EKs.

Überstände von EKs, welche 2, 21 bzw. 42 Tage gelagert wurden.

Schon bei der Aufarbeitung der EKs fielen uns immer wieder deutliche Unterschiede zwischen den EKs der verschiedenen Spender auf. Beispielsweise wiesen Überstände gleichalter EKs optisch einen deutlich unterschiedlichen Hämolysegrad auf (Abb.3.8).

Dieses Phänomen der anscheinend spenderspezifischen Diversität der EKs konnten wir teilweise auch in den weiteren Versuchen beobachten.

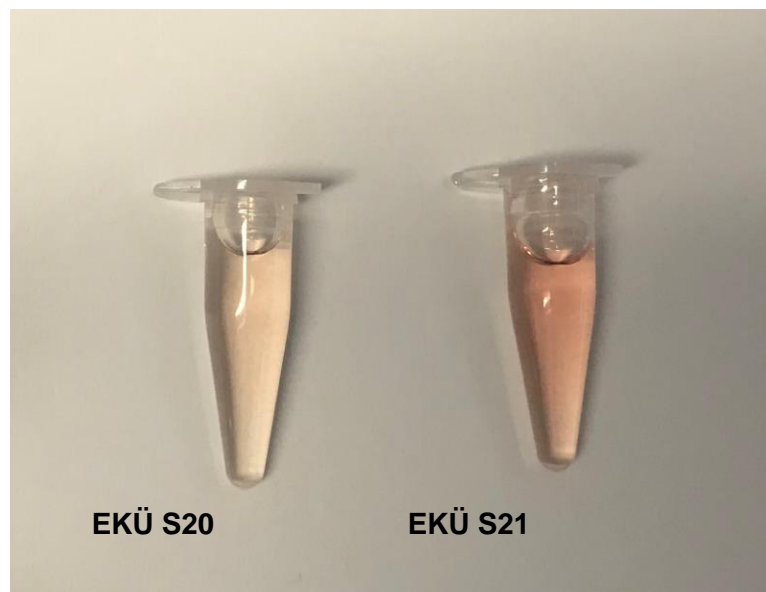


Abb.3. 8 optischer Unterschied von zwei EK Überständen des gleichen Alters

EK Überstände von zwei unterschiedlichen Spendern, beide wurden zwei Tage nach Entnahme aufgearbeitet.

Die biochemische Analyse des Überstandes von unterschiedlich lang gelagerten EKs wurde im Zentrallabor des Universitätsklinikums Bonn durchgeführt. Es zeigte sich mit verlängerter Lagerdauer eine massive Zunahme von freiem Hämoglobin. Auch die Werte des nicht an Transferrin gebundenen Eisens sowie des Kaliums stiegen über die Lagerungsdauer an, die Natriumwerte sanken leicht ab. (Tab. 3.1).

Lagerungsdauer	2 Tage	21 Tage	42 Tage
f Hämoglobin [mg/l]	187,90	1032,33	6987,00
	± 32,60	± 656,43	±3358,10
NTB [µg/dl] *	10,66	50,05	92,48
	±1,05	± 8,94	± 22,68
Na+ [mM]	142,01	128,97	116,85
	±2,74	± 3,02	± 3,25
K+ [mM]	8,84	31,62	49,34
	±3,13	±3,34	±4,03

*Non Transferrin Bound iron, nicht Transferrin gebundenes Eisen

Tab.3.1 Biochemische Analyse des Überstandes von frischen und alten EKs

Dargestellt sind Mittelwerte ±Standardabweichung, n=6

3.2.2. Veränderung der Zellvitalität von HepG2 Zellen in Abhängigkeit vom Alter der Erythrozytenkonzentrate

Im Prozess der Regeneration des Lebergewebes von teilhepatektomierten Patienten spielt die Zellvitalität und die damit verbundene Zellproliferation eine entscheidende Rolle. Auf diesen Prozess können viele Faktoren Einfluss nehmen.

Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass die Zellproliferation durch einen zusätzlich zur OP verursachten Blutverlust beeinträchtigt ist.

Da eine Substitution durch kolloidale Lösungen diesen Effekt nicht verändert, wohl aber eine Substitution durch EKs (Matot et al. 2013; Matot et al. 2017) wird die Bedeutung einer Transfusion von EKs während einer PHx verdeutlicht.

Um zu untersuchen, ob das Alter der EKs die Zellvitalität beeinflusst, inkubierten wir im hepatischen Zellmodell HepG2 Zellen mit den jeweiligen Überständen in verschiedenen Konzentrationen (50%, 25%, 12,5%, 6,3%) über einen Zeitraum von 24 Stunden. Die Ergebnisse verglichen wir mit denen der Kontrollgruppe und errechneten den prozentualen Anteil der optischen Dichte (OD) der behandelten Zellen von der OD der Kontrollgruppe.

Je höher die Konzentrationen der EK-Überstände (EKÜ) waren, desto geringer war die Vitalität der behandelten Zellen.

Im Vergleich zwischen den Behandlungsgruppen mit frischen und alten EKÜs zeigte sich in allen Konzentrationen bei den mit alten EKs behandelten Zellen eine

bedeutend niedrigere Vitalität als bei den Zellen, welche mit frischen EKÜs behandelt worden waren (Abb.3.9).

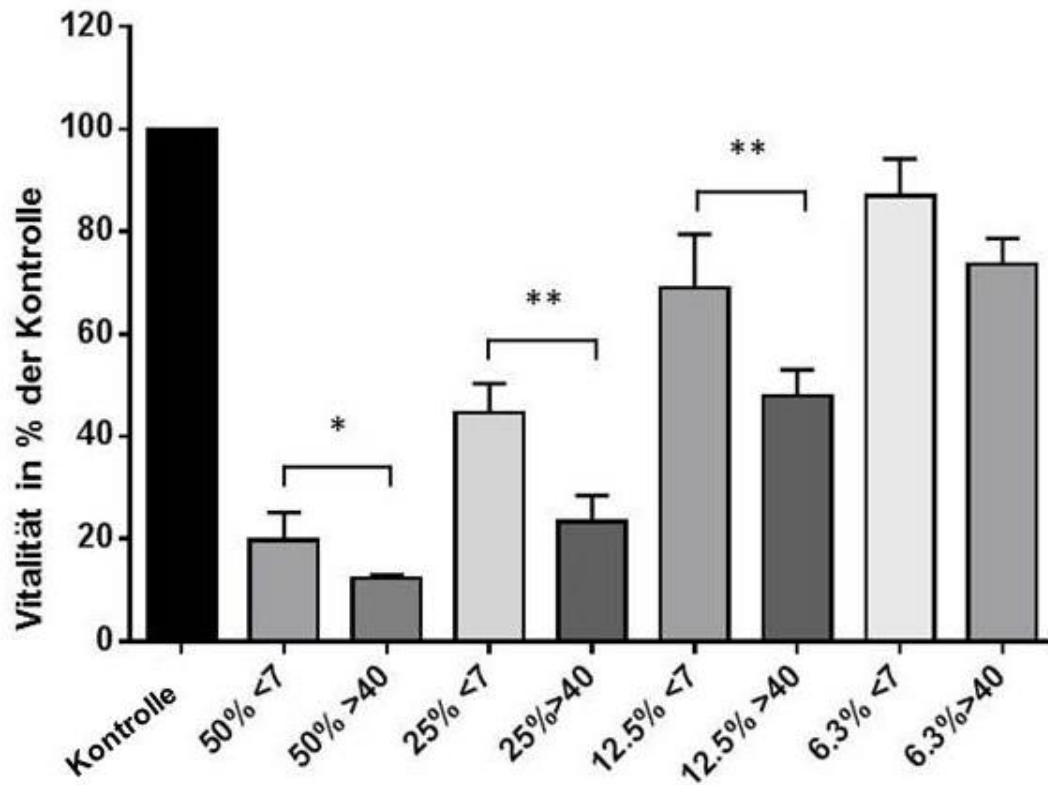


Abb.3. 9 Einfluss der Überstände unterschiedlich lang gelagerter EKs auf die Vitalität von HepG2 Zellen.

HepG2 Zellen wurden wie unter 2.1.1. beschrieben gezüchtet und mit den angegebenen Konzentrationen frischer (<7 Tage) und alter (>40 Tage) EKÜs für 24 Stunden inkubiert. Die Vitalität wurde mittels MTT-Assay bestimmt.

Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichung, * $p < 0,05$ vs. Kontrolle, ** $p < 0,01$ vs. Kontrolle, $n=12$, (1-way ANOVA; Post Test: Dunnet's Test)

3.2.3. Veränderung der Expression verschiedener Gene durch den Einfluss von EKÜs unterschiedlichen Alters im humanen *in-vitro* Modell

Nach den Genexpressionsuntersuchungen der Tierproben analysierten wir im nächsten Schritt in humanen *in-vitro* Modellen den Einfluss des Alters von EKs auf Zellen, welche am Prozess der Leberregeneration beteiligt sind.

Hierfür inkubierten wir Leber-, Endothel sowie monozytäre Zellen über einen Zeitraum von 6 bzw. 24 Stunden bei 37°C unter normoxischen Bedingungen (21% O₂, Nx) sowie unter hypoxischen Bedingungen (1% O₂ , Hx) mit Überständen von 2, 21 und 42 Tage alten EKs. Wir wählten eine Konzentration von 20%, welche in etwa der Konzentration von „Fremdblut“ im menschlichen Körper nach Infusion von drei bis vier Erythrozytenkonzentraten entspricht.

Anschließend wurde nach RNA Extraktion mittels q-PCR die Auswirkung der EKÜs auf die Expression verschiedener Gene bestimmt. Da im Tiermodell gezeigt werden konnte, dass sich nach einer PHx mit zusätzlicher Blutung hypoxische Areale im Lebergewebe bilden, wählten wir Gene, welche eine wichtige Rolle während der Anpassung der Zelle an hypoxische Bedingungen spielen. Zum anderen untersuchten wir den Einfluss auf die Expression von Genen, welche durch immunologische Prozesse beeinflusst werden.

3.2.3.1. Veränderung der Expression des Transkriptionsfaktors HIF-1 α durch EKÜs unterschiedlichen Alters in

In HepG2 Zellen änderte weder unter normoxischen noch unter hypoxischen Bedingungen eine Inkubation mit unterschiedlich alten EKÜs die HIF-1 α Expression signifikant (Abb.3.10 und Abb.3.11).

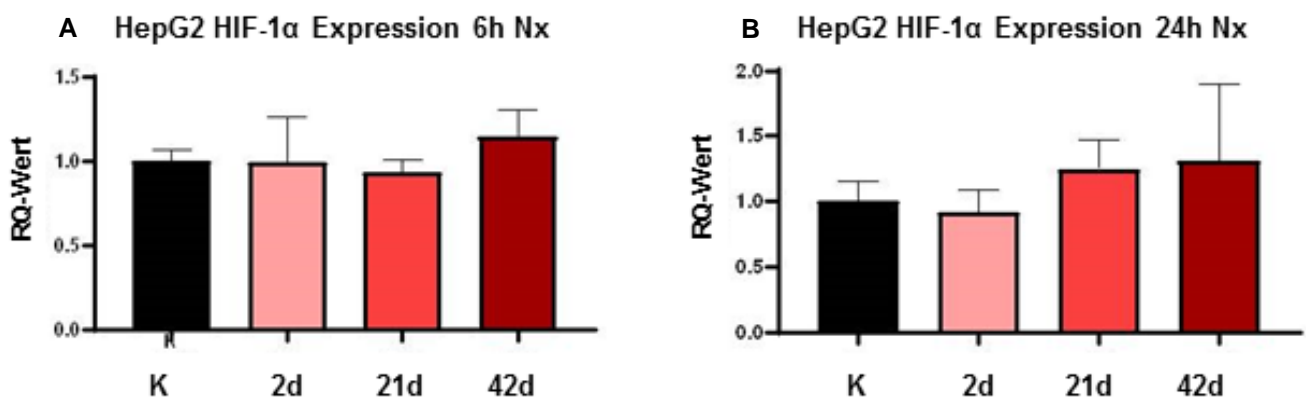


Abb.3. 10 Beeinflussung der HIF-1 α Expression in HepG2 Zellen nach Inkubation mit EKs unterschiedlichen Alters unter normoxischen Bedingungen (Nx).

HepG2 Zellen wurden für 6 bzw.24 Stunden mit den jeweiligen EK Überständen bei 37°C unter Nx Bedingungen (21% O₂) inkubiert. Anschließend wurde mittels q-PCR die HIF-1 α Expression bestimmt.

n=6 (1-way ANOVA; Post Test: Dunnet's Test)

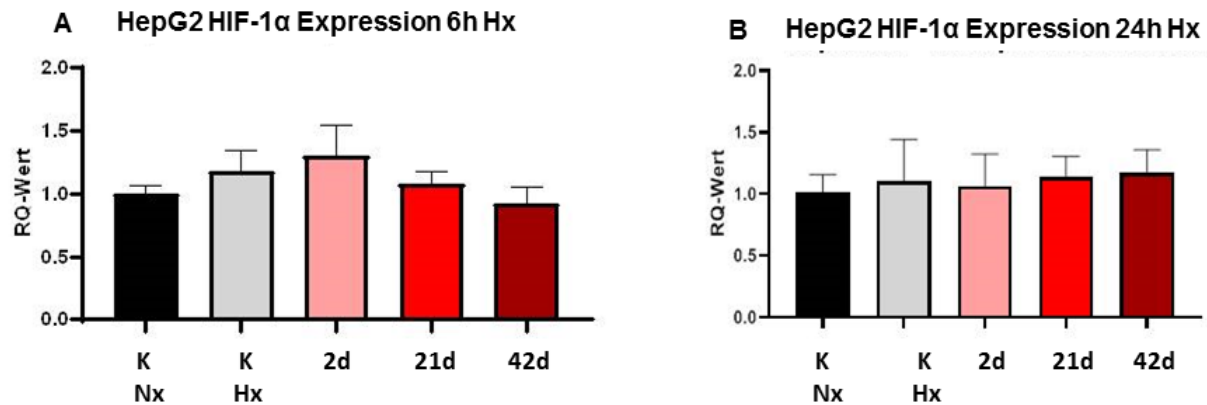


Abb.3. 11 Beeinflussung der HIF-1α Expression in HepG2 Zellen nach Inkubation mit EKs unterschiedlichen Alters unter hypoxischen Bedingungen (Hx).

HepG2 Zellen wurden für 6 bzw. 24 Stunden mit den jeweiligen EK Überständen bei 37°C unter Hx Bedingungen (1% O₂) inkubiert. Anschließend wurde mittels q-PCR die HIF-1α Expression bestimmt.

n=6 (1-way ANOVA; Post Test: Dunnet's Test)

Im Prozess der Leberregeneration haben Zellen des angeborenen Immunsystems wie Monozyten, bzw. Makrophagen einen entscheidenden Einfluss, da sie durch Sekretion von Zytokinen wie TNF-α oder IL-6 verschiedene Signalwege der Leberregeneration aktivieren (Gilgenkrantz und Collin de l'hortet, 2011).

In THP-1 Zellen zeigte sich nach Inkubation mit den EK Überständen unter normoxischen Bedingungen keine signifikante Veränderung der HIF-1α Expression (Abbildungen siehe Anhang).

3.2.3.2. Beeinflussung der Expression Hypoxie-regulierter Gene durch EKÜs unterschiedlichen Alters

Um eine bessere Versorgung der Zelle mit Glukose unter hypoxischen Bedingungen zu gewährleisten, steigt die GLUT-1 Expression bei niedriger Sauerstoffsättigung an (Loike et al., 1992). In HepG2 Zellen änderte sich nach einer 6 bzw. 24 stündigen Inkubation mit den unterschiedlichen EK Überständen unter Nx Bedingungen die GLUT-1 Expression in HepG2 Zellen nicht signifikant (Abb.3.12).

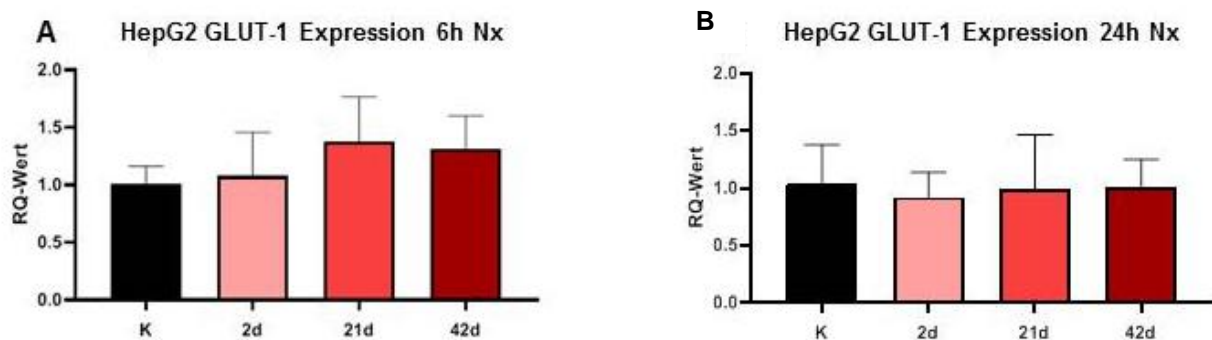


Abb.3. 12 Beeinflussung der GLUT-1 Expression in HepG2 Zellen nach Inkubation mit EKs unterschiedlichen Alters unter normoxischen Bedingungen (Nx).

HepG2 Zellen wurden für 6 bzw.24 Stunden mit den jeweiligen EK Überständen bei 37°C unter Nx Bedingungen (21% O₂) inkubiert. Anschließend wurde mittels q-PCR die GLUT-1 Expression bestimmt.

n=6 (1-way ANOVA; Post Test: Dunnet's Test)

Nach 6 stündiger Inkubation unter hypoxischen Bedingungen sank die GLUT-1 Expression der mit 21 und 42 Tagen alten EKÜs behandelten HepG2 Zellen im Vergleich zur Hypoxie Kontrolle signifikant ab. Die mit 2 Tage alten EKÜs behandelten HepG2 Zellen zeigten nach gleicher Inkubation eine moderate, aber nicht signifikante Reduktion der GLUT-1 Expression gegenüber der Hypoxie Kontrolle, im Vergleich zur Normoxie Kontrolle dagegen einen leichten, statistisch signifikanten Anstieg der GLUT-1 Expression (Abb.3.13.A).

Nach 24 stündiger Inkubation zeigte sich keine statistisch signifikante Änderung der GLUT-1 Expression (Abb.3.13B).

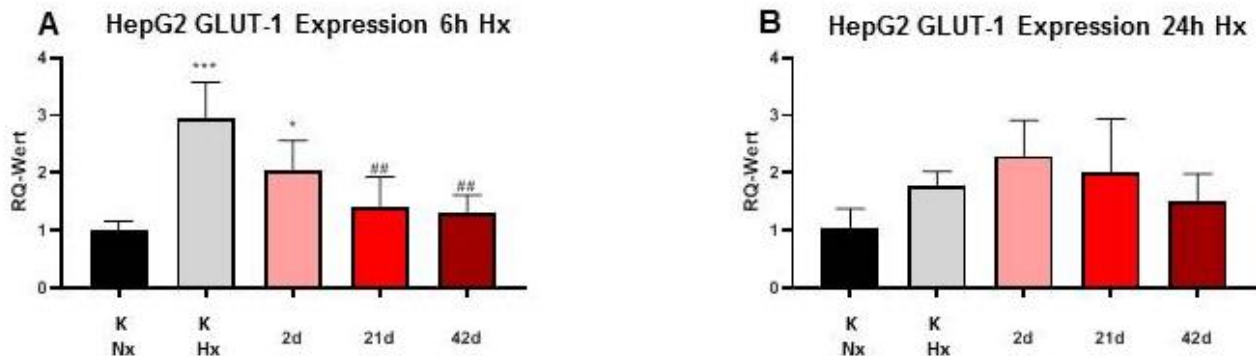


Abb.3. 13 Beeinflussung der GLUT-1 Expression in HepG2 Zellen nach Inkubation mit EKs unterschiedlichen Alters unter hypoxischen Bedingungen (Hx).

HepG2 Zellen wurden für 6 bzw. 24 Stunden mit den jeweiligen EK Überständen bei 37°C unter Hx Bedingungen (1% O₂) inkubiert. Anschließend wurde mittels q-PCR die GLUT-1 Expression bestimmt.

Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichung, * P<0,05 vs. Kontrolle Nx, ** P<0,01 vs. Kontrolle Nx, *** P<0,001 vs. Kontrolle Nx, # P<0,05 vs. Kontrolle Hx, ## P<0,01 vs. Kontrolle Hx, ### P<0,001 vs. Kontrolle Hx,

n=6 (1-way ANOVA; Post Test: Dunnet's Test)

Da Erythropoietin durch eine Anregung der Erythropoiese die Gewebsoxygenierung deutlich verbessert (Erslev und Gabuzda, 1985), steigt die EPO Konzentration im Plasma und im Gewebe unter hypoxischen Bedingungen gravierend an (Jelkmann, 1992).

Die Expression von EPO in HepG2 Zellen bei den unterschiedlichen Spendern war sehr variabel und es ließ sich weder nach einer Inkubation über 6 Stunden noch über 24 Stunden ein Muster von Suppression oder Induktion der EPO Expression durch die verschieden alten EKÜs erkennen (Abb.3.14).

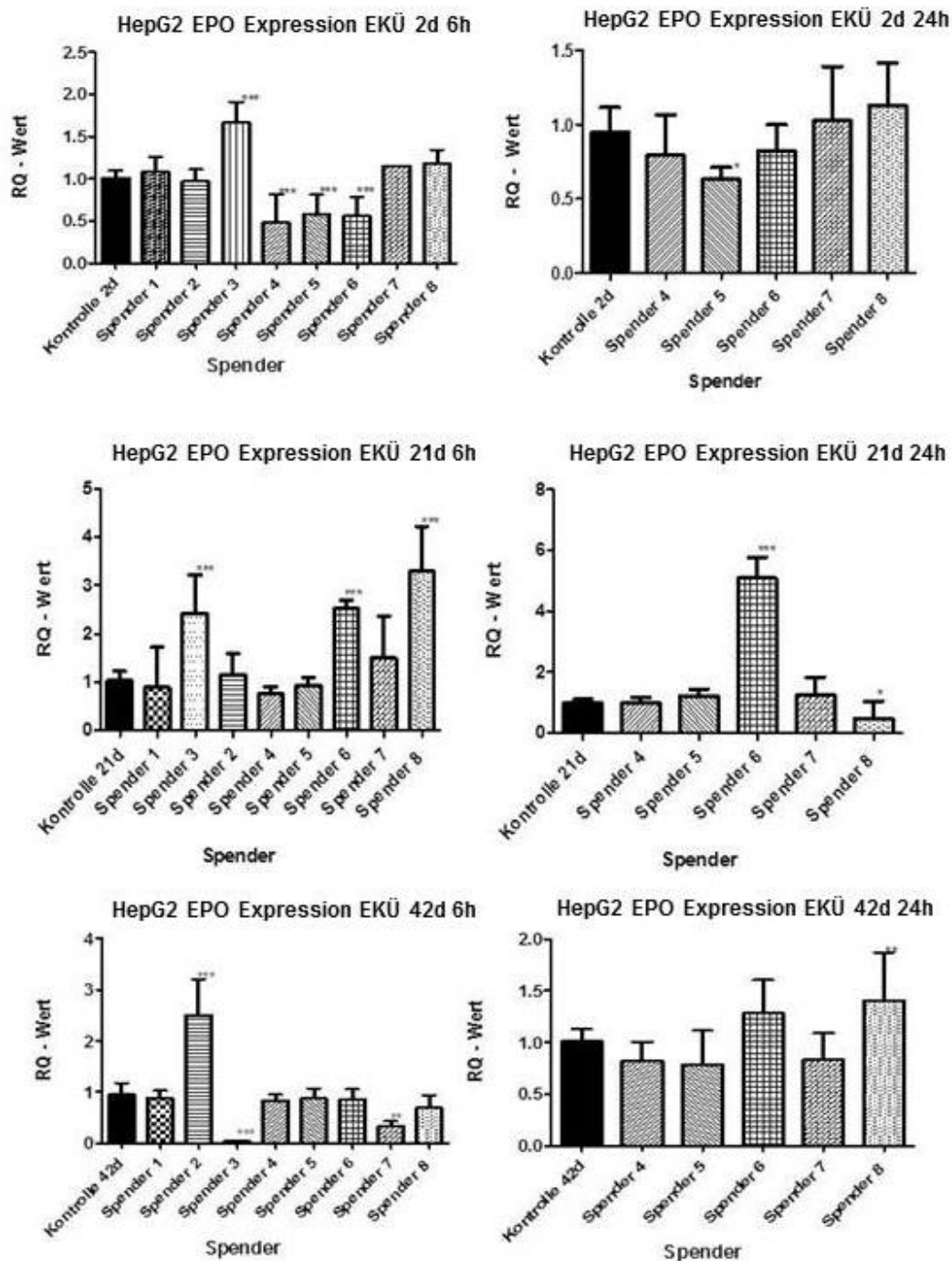


Abb.3. 14 Beeinflussung der EPO Expression in HepG2 Zellen nach Inkubation mit EKs unterschiedlichen Alters unter normoxischen Bedingungen (Nx).

HepG2 Zellen wurden für 6 bzw. 24 Stunden mit den jeweiligen EK Überständen bei 37°C unter Nx Bedingungen (21% O₂) inkubiert. Anschließend wurde mittels q-PCR die EPO Expression bestimmt.

Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichung, * P<0,05 vs. Kontrolle Nx, ** P<0,01 vs. Kontrolle Nx, *** P<0,001 vs. Kontrolle Nx

n=3 (1-way ANOVA; Post Test: Dunnet's Test)

3.2.3.3. Beeinflussung der Expression endothelialer Wachstumsfaktoren und inflammatorischer Zytokine durch EKÜs unterschiedlichen Alters

Wir inkubierten Leberparenchym-, monozytäre sowie endotheliale Zellen, als solche Zellen, die am Prozess der Leberregeneration beteiligt sind, für 6 bzw. 24 Stunden mit Überständen der EKs (20%) bei 37°C sowohl unter normoxischen als auch unter hypoxischen Bedingungen. Anschließend wurde mittels q-PCR die Expression unterschiedlicher endothelialer Wachstumsfaktoren und inflammatorischer Zytokine bestimmt.

Als HIF- Zielgen ist VEGF in der Anpassung an hypoxische Bedingungen äußerst wichtig (Levy et al., 1995; Vincent et al., 2000). Durch den Wachstumsfaktor kommt es im Rahmen der Angiogenese zu einer Vasorelaxation, einer erhöhten Gefäßpermeabilität sowie zu einer vermehrten endotheliale Zellmigration und -proliferation (Karkkainen und Petrova, 2000, Ylä-Herttuala, 2007). Durch VEGF wird das Wachstum endothelialer Zellen gefördert und apoptotische Prozesse verhindert (Kajdaniuk et al., 2011). Für den Prozess der Leberregeneration ist die Neubildung von Gefäßen, die Angiogenese, unersetzlich. In diesem Prozess stellt der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF) eine Schlüsselrolle dar (Ferrara, 2009).

Unter normoxischen Bedingungen stieg die VEGF Expression von HPME Zellen nach Inkubation mit EKÜs unterschiedlichen Alters signifikant an. Am deutlichsten zeigte sich dieser Effekt bei 2 Tage alten EKÜs (Abb.3.15.A). Eine 24 stündige Inkubation veränderte die VEGF Expression nicht signifikant (Abb.3.15.B).

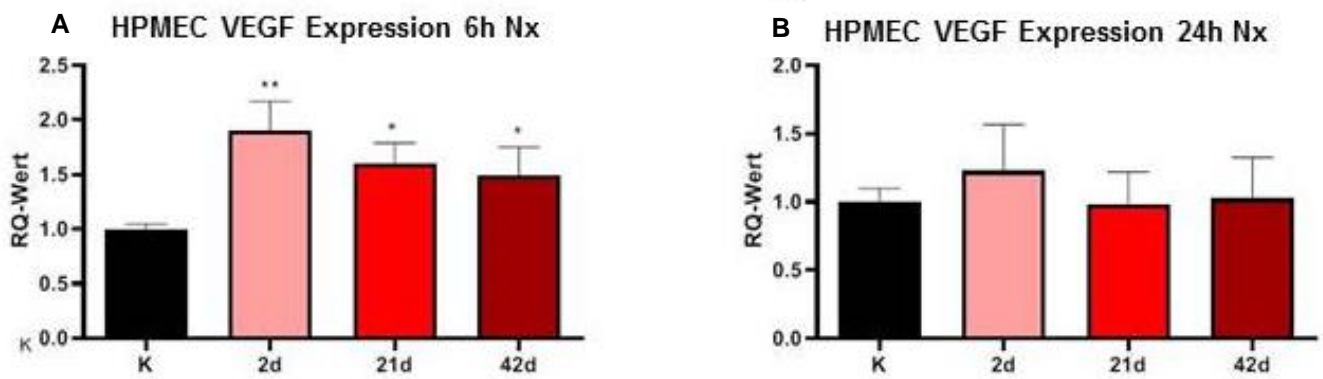


Abb.3. 15 Beeinflussung der VEGF Expression in HPME Zellen nach Inkubation mit EKs unterschiedlichen Alters unter normoxischen Bedingungen (Nx).

HPME Zellen wurden für 6 bzw. 24 Stunden mit den jeweiligen EK Überständen bei 37°C unter Nx Bedingungen (21% O₂) inkubiert. Anschließend wurde mittels q-PCR die VEGF Expression bestimmt.

Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichung, * P<0,05 vs. Kontrolle Nx, ** P<0,01 vs. Kontrolle Nx, *** P<0,001 vs. Kontrolle Nx

n=6 (1-way ANOVA; Post Test: Dunnet's Test)

Sowohl nach 6 als auch nach 24 Stunden zeigte sich bei den HPME Zellen, die unter hypoxischen Bedingungen mit EKÜs inkubiert worden waren, eine signifikante Steigerung der VEGF Expression im Vergleich zur Nx Kontrolle (Abb.3.16).

Im Vergleich zur Hx Kontrolle war sie nach 6 Stunden signifikant gemindert (Abb.3.16.A), nach 24 Stunden dagegen nicht signifikant verändert (Abb.3.16.B).

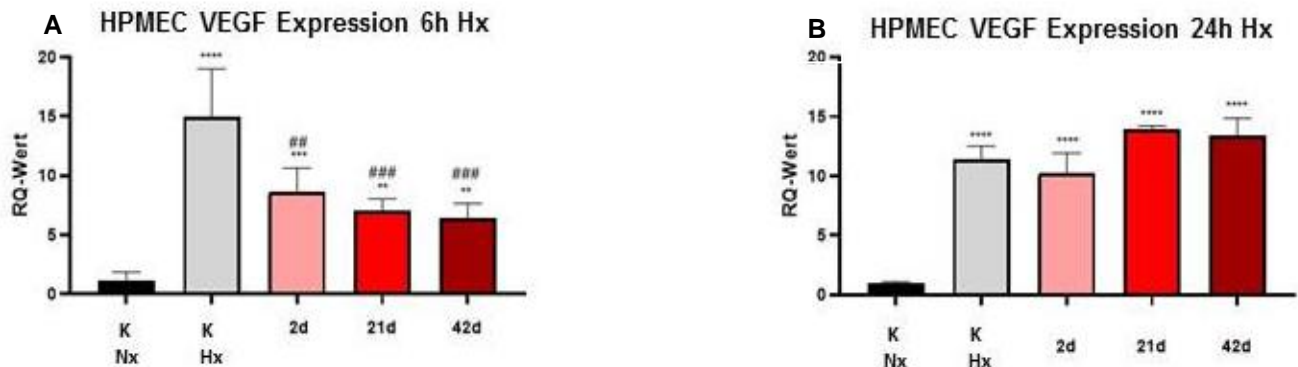


Abb.3. 16 Beeinflussung der VEGF Expression in HPME Zellen nach Inkubation mit EKs unterschiedlichen Alters unter hypoxischen Bedingungen (Hx).

HPME Zellen wurden für 6 bzw. 24 Stunden mit den jeweiligen EK Überständen bei 37°C unter Hx Bedingungen (1% O₂) inkubiert. Anschließend wurde mittels q-PCR die VEGF Expression bestimmt.

Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichung, * P<0,05 vs. Kontrolle Nx, ** P<0,01 vs. Kontrolle Nx, *** P<0,001 vs. Kontrolle Nx, # P<0,05 vs. Kontrolle Hx, ## P<0,01 vs. Kontrolle Hx, ### P<0,001 vs. Kontrolle Hx,

n=6 (1-way ANOVA; Post Test: Dunnet's Test)

Eine Inkubation von THP-1 Zellen mit den unterschiedlichen Überständen bewirkte keine signifikante Veränderung der VEGF Expression (Abbildungen siehe Anhang).

Das Zytokin IL1- β wird unter anderem von Endothelzellen exprimiert. Neben infektiösen und toxischen Reizen, erhöhen auch inflammatorische Stimuli die IL1- β Expression (Dinarello, 2005).

Da sich die IL-1 β Expression der HPME Zellen nach Inkubation mit den EKÜs der unterschiedlichen Spendern signifikant unterschieden hat, werden hier exemplarisch die Ergebnisse von zwei Spendern getrennt voneinander dargestellt.

Unter Nx Bedingungen änderte sich nach 24 Stunden die IL-1 β Expression nur bei den Zellen, die mit 42 Tage alten EKÜs inkubiert worden waren (Abb. 3.17.A).

Unter Hx Bedingungen stiegen die IL-1 β Expression in allen mit EKÜ behandelten Zellen im Vergleich zur Nx Kontrolle signifikant an. Die Zellen, die mit 42 Tage altem EKÜ des Spenders 18 inkubiert worden waren zeigten auch im Vergleich zur Hx Kontrolle einen signifikanten Anstieg. Diesen Effekt konnten wir auch bei den Zellen beobachten, die mit 21 Tage altem EKÜ des Spenders 19 inkubiert worden waren (Abb.3.17.B).

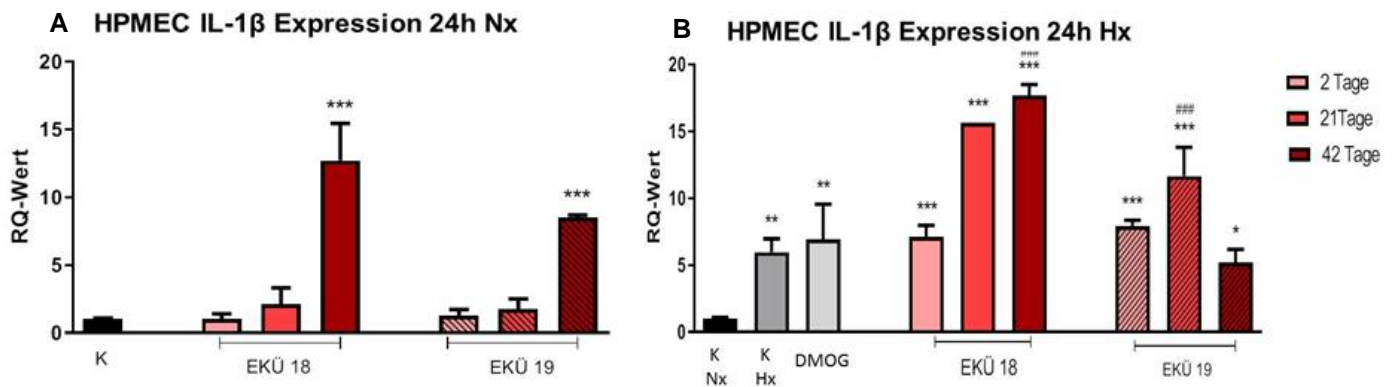


Abb.3. 17 Beeinflussung der IL-1β Expression in HPME Zellen nach Inkubation mit EKs unterschiedlichen Alters unter normoxischen (Nx) und hypoxischen Bedingungen (Hx).

HPME Zellen wurden für 24 Stunden mit den jeweiligen EK Überständen bei 37°C unter Nx (21% O₂) und Hx Bedingungen (1% O₂) inkubiert. Anschließend wurde mittels q-PCR die IL-1β Expression bestimmt.

Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichung, * P<0,05 vs. Kontrolle Nx, ** P<0,01 vs. Kontrolle Nx, *** P<0,001 vs. Kontrolle Nx, # P<0,05 vs. Kontrolle Hx, ## P<0,01 vs. Kontrolle Hx, ### P<0,001 vs. Kontrolle Hx,

n=3 (1-way ANOVA; Post Test: Dunnet's Test)

Unter dem Aspekt, dass IL-8 eine Diapedese fördernde Wirkung hat (Baggiolini und Clark-Lewis, 1992) und ein potenter Angiogenese Faktor ist (Jiang, 2011), interessierten wir uns für die Beeinflussung der IL-8 Expression in HepG2 und HPME Zellen durch EKÜs unterschiedlichen Alters.

Auch die Ergebnisse der IL-8 q-PCR von HepG2 Zellen, welche mit unterschiedlichen EKÜs inkubiert worden waren, wiesen eine sehr hohe Heterogenität zwischen den einzelnen Spendern ohne ein erkennbares Muster der Supprimierung oder Induktion auf (Abb.3.18).

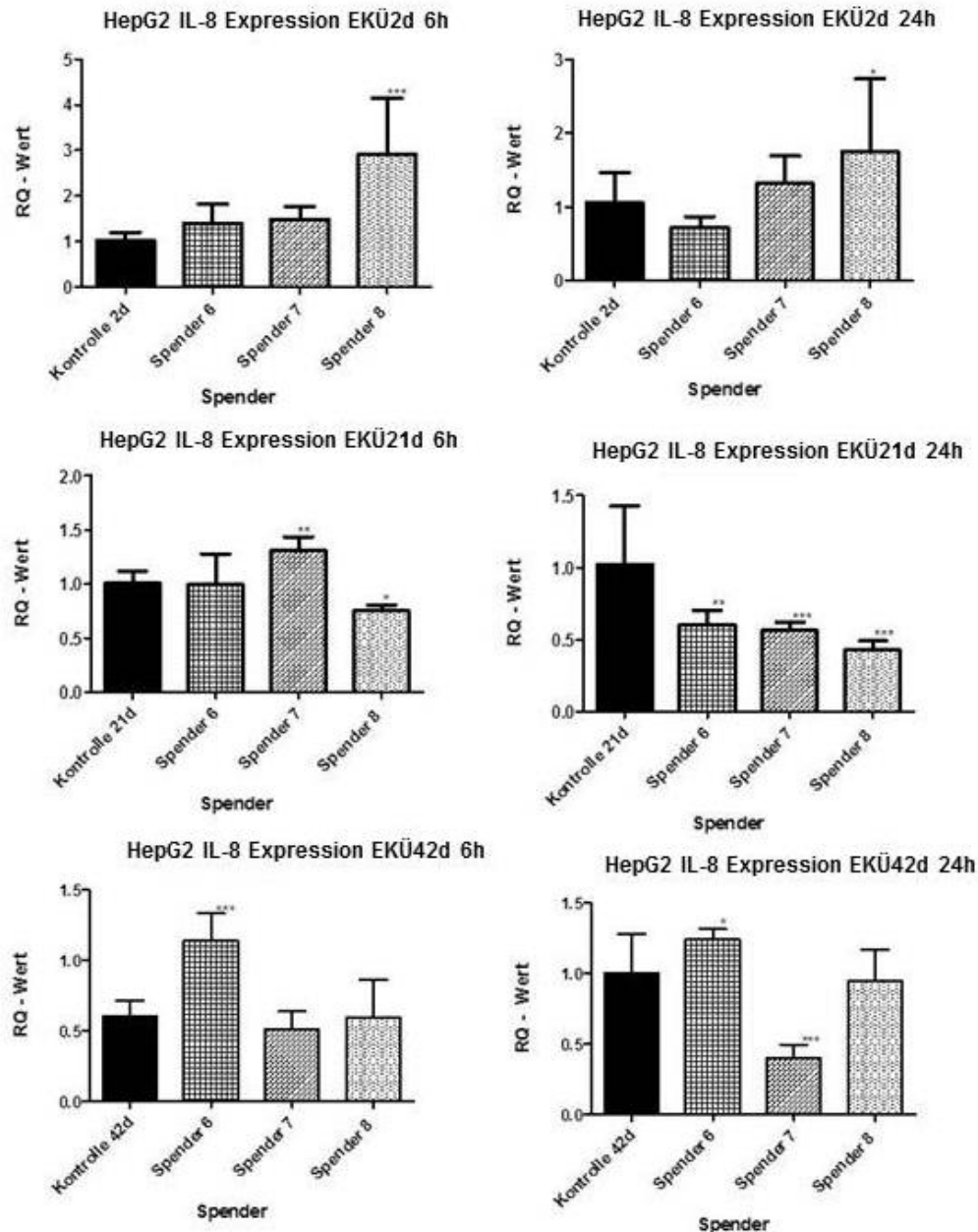


Abb.3. 18 Beeinflussung der IL-8 Expression in HepG2 Zellen nach Inkubation mit EKs unterschiedlichen Alters.

HepG2 Zellen wurden für 6 bzw. 24 Stunden mit den jeweiligen EK Überständen bei 37°C unter Nx Bedingungen (21% O₂) inkubiert. Anschließend wurde mittels q-PCR die IL-8 Expression bestimmt.

Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichung, *** P<0,001 vs. Kontrolle, ** P<0,01 vs. Kontrolle, *P<0,05 vs. Kontrolle *** P<0,001 vs. Kontrolle, n=3, (1-way ANOVA; Post Test: Dunnet's Test)

Die Ergebnisse der IL-8 Genexpressionsanalyse von HPME Zellen, die wir mit EKÜs unterschiedlicher Spender inkubierten zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Spendern, weshalb sie hier zusammengefasst dargestellt sind. Sowohl nach 6 als auch nach 24 stündiger Inkubation unter Nx Bedingungen mit 2 Tage altem EK Überstand stieg die IL-8 Expression der HPME Zellen signifikant an (Abb.3.19).

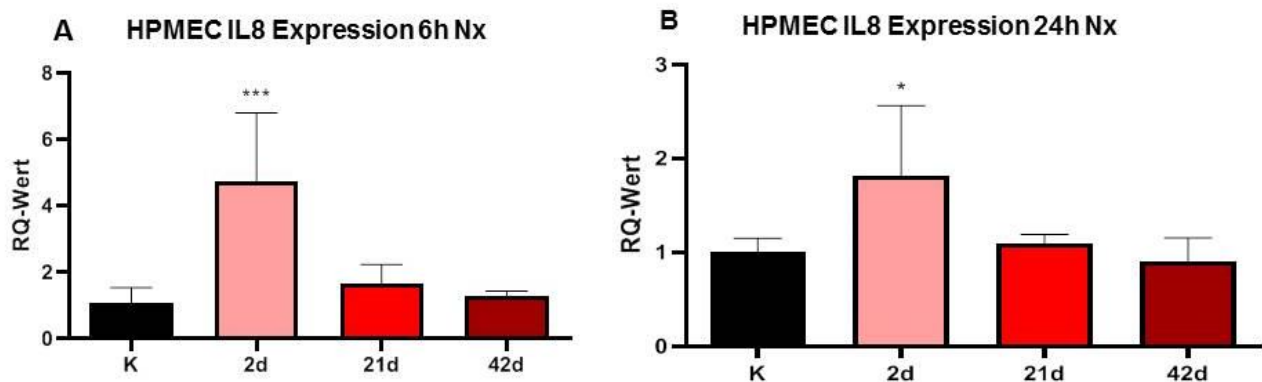


Abb.3. 19 Beeinflussung der IL-8 Expression in HPME Zellen nach Inkubation mit EKs unterschiedlichen Alters unter normoxischen Bedingungen (Nx).

HPME Zellen wurden für 6 bzw. 24 Stunden mit den jeweiligen EK Überständen bei 37°C unter Nx (21%O₂) Bedingungen inkubiert. Anschließend wurde mittels q-PCR die IL-8 Expression bestimmt.

Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichung, * P<0,05 vs. Kontrolle Nx, ** P<0,01vs. Kontrolle Nx, *** P<0,001 vs. Kontrolle Nx

n=6 (1-way ANOVA; Post Test: Dunnet's Test)

Eine 6 stündige Inkubation unter hypoxischen Bedingungen mit 2 Tage alten EKs bewirkte einen signifikanten Anstieg in der IL8 Expression (Abb.3.20A). Nach 24 Stunden Inkubation unter Hx Bedingungen sank die Expression in den Zellen, die mit 21 und 42 Tage alten EKÜs inkubiert worden waren signifikant (Abb. 3.20B).

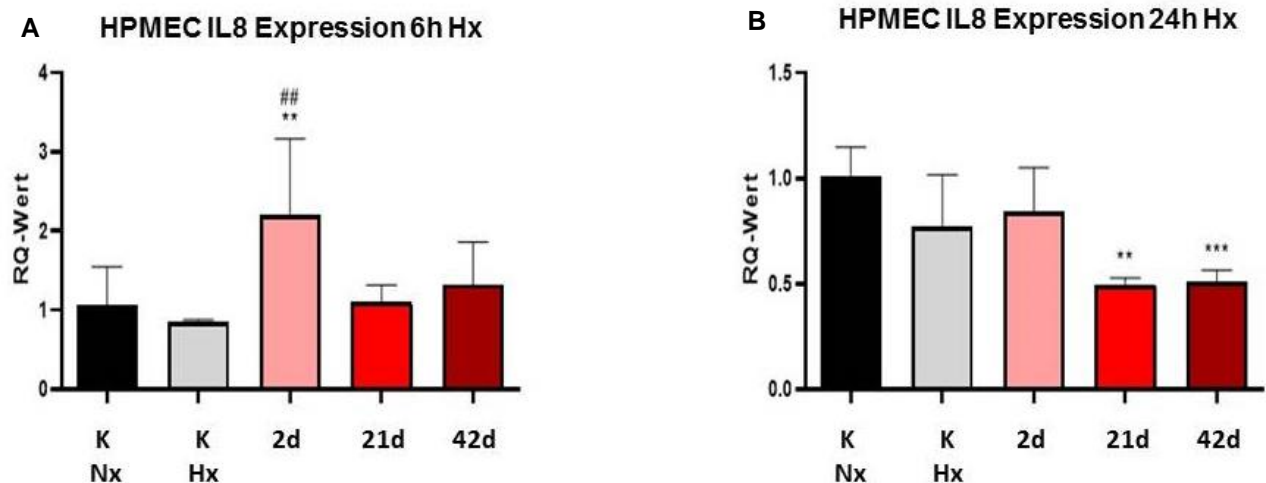


Abb.3. 20 Beeinflussung der IL-8 Expression in HPME Zellen nach Inkubation mit EKs unterschiedlichen Alters unter hypoxischen Bedingungen (Hx).

HPME Zellen wurden für 24 Stunden mit den jeweiligen EK Überständen bei 37°C unter Hx (1% O₂) Bedingungen inkubiert. Anschließend wurde mittels q-PCR die IL-1 β Expression bestimmt.

Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichung, * P<0,05 vs. Kontrolle Nx, ** P<0,01 vs. Kontrolle Nx, *** P<0,001 vs. Kontrolle Nx, # P<0,05 vs. Kontrolle Hx, ## P<0,01 vs. Kontrolle Hx, ### P<0,001 vs. Kontrolle Hx,

n=6 (1-way ANOVA; Post Test: Dunnet's Test)

Der Wachstumsfaktor Angiopoetin-2 wird unter physiologischen Bedingungen in nur sehr geringem Maße von Endothelzellen exprimiert. Gesteigert wird die ANG-2 Expression während Prozessen der Angiogenese sowie durch hypoxische und inflammatorische Stimuli (Thurston und Daly, 2012). ANG-2 aktiviert unter anderem ruhendes Endothel und bewirkt somit eine Sensibilisierung für exogene Stimuli (Fiedler und Augustin, 2006), außerdem bewirkt es eine Hyperpermeabilität im Endothel (Parikh et al., 2006, Semenza et al., 2010). Um zu untersuchen, ob frische oder alte EKÜs die ANG-2 Expression von HPME Zellen beeinflussen, wurden diese über einen Zeitraum von 24 Stunden mit Überständen von EKs unterschiedlichen Alters inkubiert. Anschließend wurde die ANG-2 Expression mittels q-PCR bestimmt. Alle behandelten Zellen wiesen eine signifikante Erhöhung der ANG-2 Expression auf. Der RQ-Wert der mit Überständen frischer EKs inkubierten Zellen, lag ca. 100fach über dem der Kontrollgruppe. Der RQ-Wert der Zellen, welche für 24 Stunden mit Überständen von alten EKs behandelt worden waren, lag ca. 300fach über dem der Kontrollgruppe (Abb.3.21).

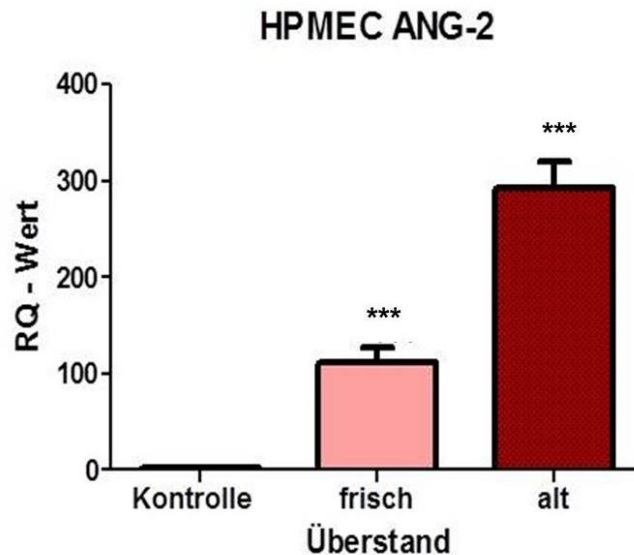


Abb.3. 21 Beeinflussung der ANG-2 Expression in HPME Zellen nach Inkubation mit EKs unterschiedlichen Alters unter normoxischen Bedingungen (Nx).

HPME Zellen wurden für 24 Stunden mit den jeweiligen EK Überständen bei 37°C unter Nx Bedingungen (21%O₂) inkubiert. Anschließend wurde mittels q-PCR die ANG-2 Expression bestimmt.

Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichung, ** P<0,01 vs. Kontrolle, *** P<0,001 vs. Kontrolle, n=6, (1-way ANOVA; Post Test: Dunnet's Test)

Im Rahmen der Diapedese fördert das transmembrane Glykoprotein ICAM-1 die Adhäsion zwischen Leukozyten und Endothelzellen (Bella et al., 1998). Neben monozytären Zellen exprimieren auch Endothelzellen ICAM-1 und verstärken somit die Adhäsion von Endothelzellen und Monozyten (Winning et al., 2010).

Da eine verstärkte Adhäsion von Leukozyten am Endothel die Mikrozirkulation in den Lebergefäßen negativ beeinflussen könnte, sollte im nächsten Schritt überprüft werden, ob EKs unterschiedlichen Alters Einfluss auf die ICAM-1 Expression von Endothel- oder monozytären Zellen haben und somit die Diapedese fördern.

Nach 6 stündiger Inkubation unter Nx Bedingungen zeigte sich bei den mit 2 Tage alten EKÜs behandelten HPME Zellen ein leichter, aber nicht signifikanter Anstieg der ICAM-1 Expression, bei den mit 42 Tage alten EKÜs behandelten Zellen ein leichter Abfall, ebenfalls nicht signifikant (Abb.3.22A).

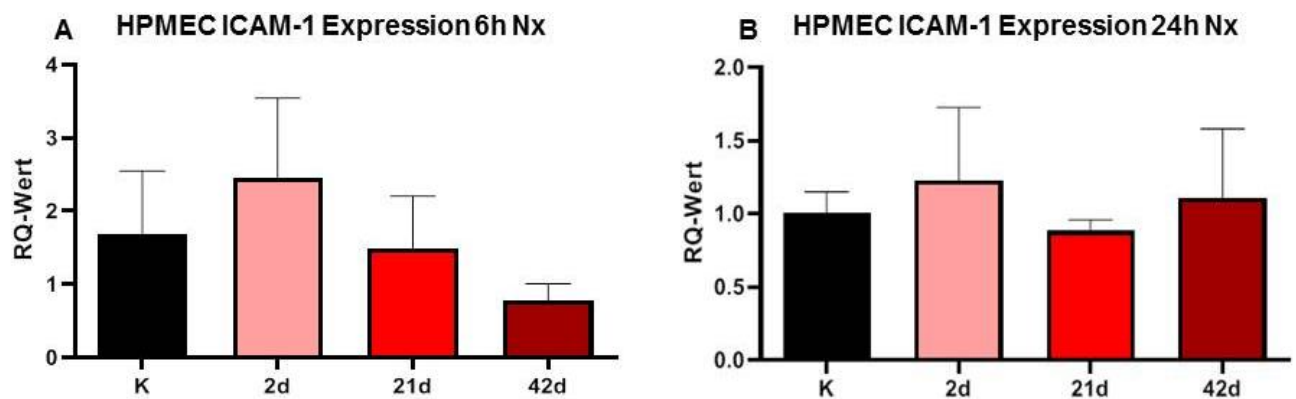


Abb.3. 22 Beeinflussung der ICAM-1 Expression in HPME Zellen nach Inkubation mit EKÜs unterschiedlichen Alters unter normoxischen Bedingungen (Nx).

HPME Zellen wurden für 6 bzw. 24 Stunden mit den jeweiligen EK Überständen bei 37°C unter Nx Bedingungen (21% O₂) inkubiert. Anschließend wurde mittels q-PCR die ICAM-1 Expression bestimmt.

Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichung, * P<0,05 vs. Kontrolle Nx, ** P<0,01vs. Kontrolle Nx, *** P<0,001 vs. Kontrolle Nx

n=6 (1-way ANOVA; Post Test: Dunnet's Test)

Eine kurzzeitige Inkubation von 6 Stunden unter Hx Bedingungen bewirkte bei den mit 2 Tage alten EKÜs behandelten Zellen einen Anstieg der ICAM-1 Expression. Dieser war sowohl im Vergleich zur Nx als auch zur Hx Kontrolle signifikant (Abb.3.23 A). Nach 24 Stunden sank die ICAM-1 Expression im Vergleich zur Hx Kontrolle bei allen mit EKÜ behandelten Zellen signifikant ab. Am stärksten trat der Effekt bei den mit 42 Tage alten EKÜ behandelten Zellen auf (Abb.3.23B).

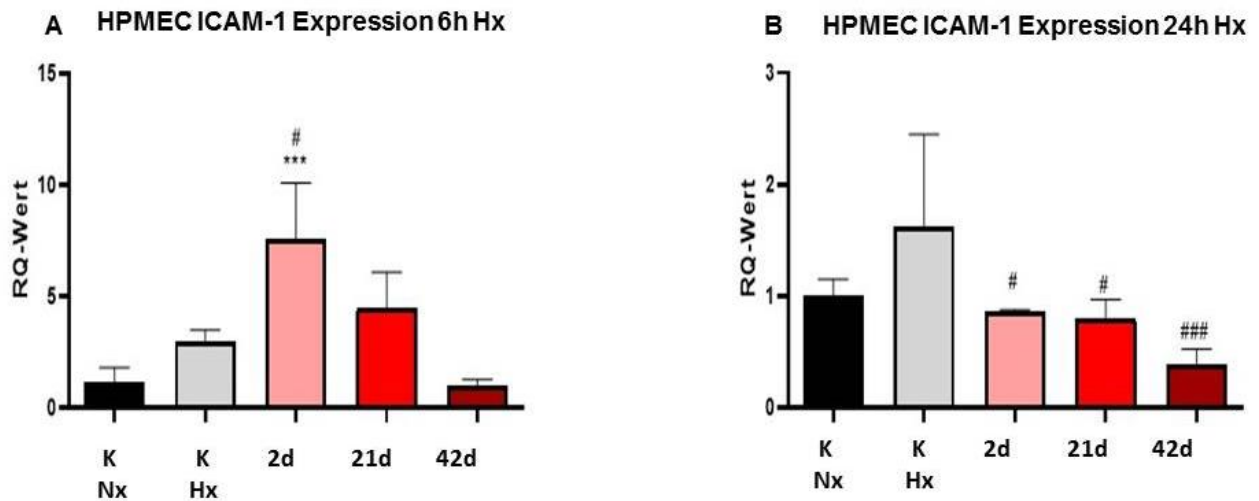


Abb.3. 23 Beeinflussung der ICAM-1 Expression in HPME Zellen nach Inkubation mit EKs unterschiedlichen Alters unter hypoxischen Bedingungen (Hx).

HPME Zellen wurden für 6 bzw. 24 Stunden mit den jeweiligen EK Überständen bei 37°C unter Hx Bedingungen (1% O₂) inkubiert. Anschließend wurde mittels q-PCR die ICAM-1 Expression bestimmt.

Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichung, * P<0,05 vs. Kontrolle Nx, ** P<0,01 vs. Kontrolle Nx, *** P<0,001 vs. Kontrolle Nx, # P<0,05 vs. Kontrolle Hx, ## P<0,01 vs. Kontrolle Hx, ### P<0,001 vs. Kontrolle Hx,

n=6 (1-way ANOVA; Post Test: Dunnet's Test)

3.2.4. Semiquantitativer HIF-1 α Nachweis in HepG2 Zellen nach Inkubation mit frischen oder alten EKÜs mittels Western Blot

HepG2 Zellen wurden mit Überständen von 2, 21 bzw. 42 Tage alten EKs weiterer Spender (S12, S13, S14) für vier Stunden unter normoxischen oder hypoxischen Bedingungen inkubiert. Als Kontrolle (K) wurden Zellen mit Medium, als positiv Kontrolle zusätzlich mit DMOG inkubiert. Durch kompetitive Hemmung von PHDs und FIH-1 bewirkt Dimethyloxallylglycin (DMOG), dass eine Hydroxilierung von HIF-1 α ausbleibt und so in den Zellkern translozieren kann (Duscher et al., 2017). Anschließend wurden die Proben wie unter 2.6.1. beschrieben aufgearbeitet und der HIF-1 α Gehalt der Zellen mittels Western Blot ermittelt. Nach Inkubation mit 2 Tage alten EKÜs unter normoxischen Bedingungen war kein HIF-1 α nachweisbar (Abb.3.24A), unter hypoxischen Bedingungen zeigte sich bei allen Spendern eine der Kontrolle vergleichbar starke HIF-1 α Bande bei 120kD (Abb.3.24B). Das gleiche Ergebnis zeigte sich nach Inkubation mit 21 Tage alten EKÜs derselben Spender (Abb.3.25 A+B). Nach Inkubation mit 42 Tage alten EKÜs unter normoxischen Bedingungen war weiterhin keine HIF-1 α Bande zu detektieren (Abb.3.26A). Unter hypoxischen Bedingungen zeigten sich diesmal im Vergleich zur Kontrolle deutlich schwächere HIF-1 α Banden bei den mit den EKÜ inkubierten Proben (Abb.3.26B).

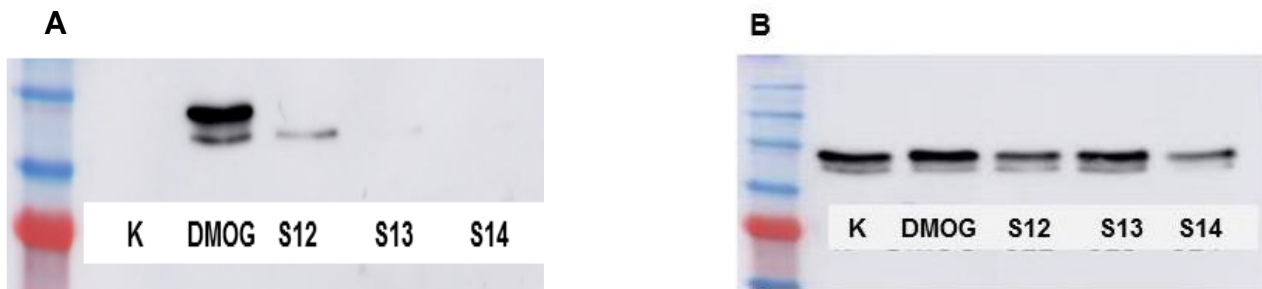


Abb.3. 24 Immunoblot zur Detektion von HIF-1 α in HepG2 Zellen nach Inkubation mit Überstand von 2d alten EKs unter (A) normoxischen und (B) hypoxischen Bedingungen.

HepG2 Zellen wurden für vier Stunden mit den jeweiligen Überständen bei 37°C unter normoxischen oder hypoxischen Bedingungen inkubiert, anschließend wurde mittels Western Blot eine semiquantitative Bestimmung der HIF-1 α Konzentration durchgeführt.

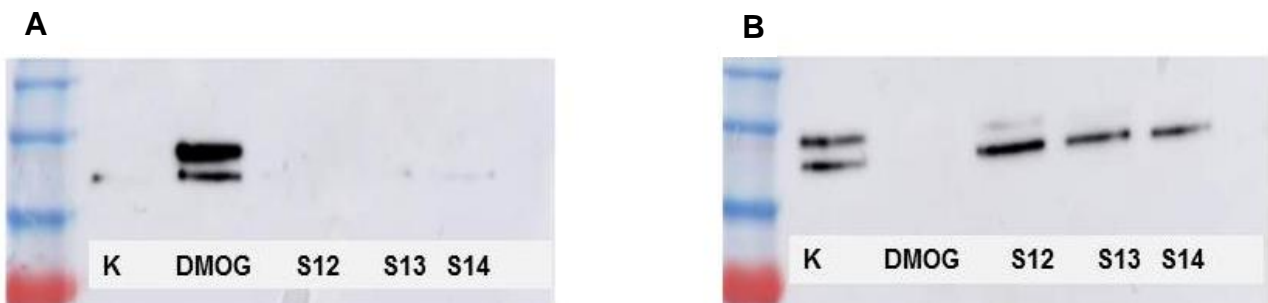


Abb.3. 25 Immunoblot zur Detektion von HIF-1 α in HepG2 Zellen nach Inkubation mit Überstand von 21d alten EKs unter (A) normoxischen und (B) hypoxischen Bedingungen.

HepG2 Zellen wurden für vier Stunden mit den jeweiligen Überständen bei 37°C unter normoxischen oder hypoxischen Bedingungen inkubiert, anschließend wurde mittels Western Blot eine semiquantitative Bestimmung der HIF-1 α Konzentration durchgeführt.

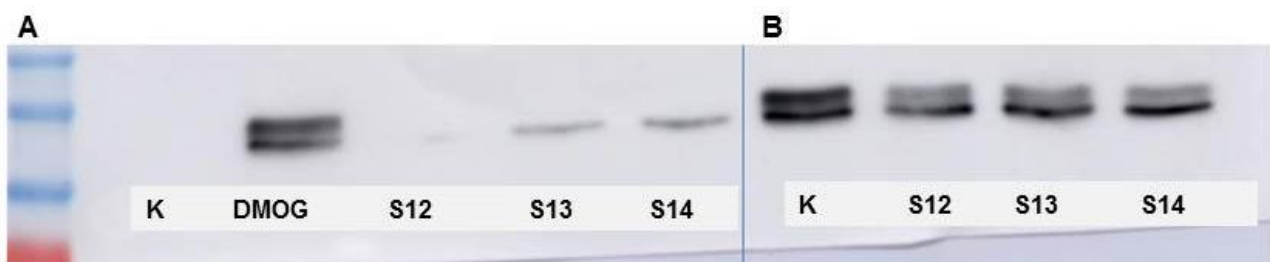


Abb.3. 26 Immunoblot zur Detektion von HIF-1 α in HepG2 Zellen nach Inkubation mit Überstand von 42d alten EKs unter (A) normoxischen und (B) hypoxischen Bedingungen.

HepG2 Zellen wurden für vier Stunden mit den jeweiligen Überständen bei 37°C unter normoxischen oder hypoxischen Bedingungen inkubiert, anschließend wurde mittels Western Blot eine semiquantitative Bestimmung der HIF-1 α Konzentration durchgeführt.

3.2.5. Quantitativer Nachweis der HIF-1 α Menge in HepG2 Zellen nach Inkubation mit frischen oder alten EKÜs mittels ELISA

HepG2 Zellen wurden für 4 Stunden mit 2, 21 bzw. 42 Tage alten EK Überständen unter normoxischen (21% O₂) oder hypoxischen (1%O₂) Bedingungen bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mittels RIPA Puffer lysiert und die HIF-1 α Konzentration mittels ELISA ermittelt. Als Positivkontrolle für die HIF-1 α Akkumulation dienten Zellen, welche mit DMOG inkubiert worden waren. Unter normoxischen Bedingungen wiesen lediglich die DMOG Kontrolle sowie in sehr geringem Maße die Zellen, die mit 42 Tagen altem EKÜ des Spenders 12 inkubiert worden waren, eine messbare HIF-1 α Konzentration auf (Abb.3.27).

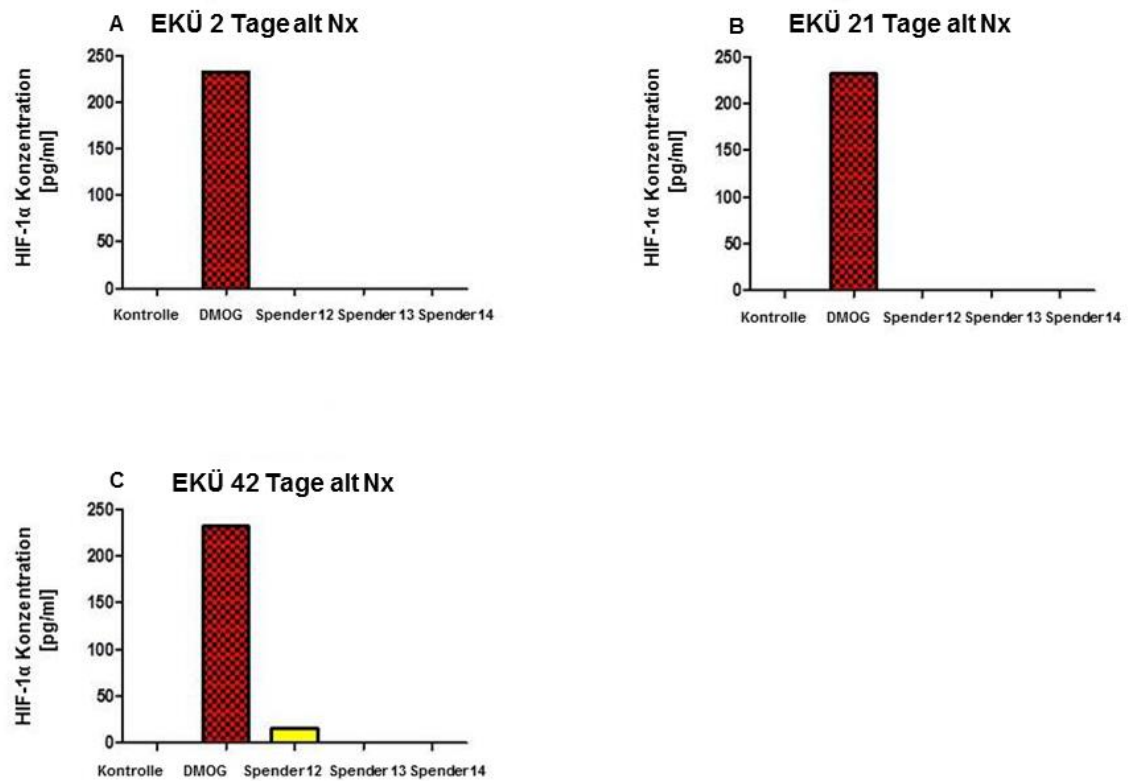


Abb.3. 27 Quantitative HIF-1α Bestimmung in HepG2 Zellen nach Inkubation mit unterschiedlich alter EKÜs unter normoxischen Bedingungen.

HepG2 Zellen wurden für 4 Stunden bei 37°C und normoxischen Bedingungen mit Überständen von EKs unterschiedlicher Spender inkubiert. Die Überstände wurden mittels Zentrifugation an Tag 2, 21 und 42 nach Abnahme gewonnen. Anschließend wurde mittels ELISA die HIF-1α Konzentration der lysierten HepG2 Zellen bestimmt.

Zellen, die unter hypoxischen Bedingungen mit 2 Tage alten EKÜs der Spender 12 und 14 inkubiert worden waren, zeigten eine reduzierte HIF-1 α Konzentration. 2 Tage alte EKÜs des Spenders 13 bewirkten einen geringgradigen Anstieg des HIF-1 α Gehaltes. (Abb.3.28A).

Eine Inkubation mit 21 Tage alten EKÜs aller Spender hatte eine Reduktion der HIF-1 α Konzentration in den HepG2 Zellen zur Folge (Abb.3.28B).

Die Zellen, die 42 Tage alten EKÜs ausgesetzt worden waren, wiesen keine messbare HIF-1 α Konzentration mehr auf (Abb.3.28C).

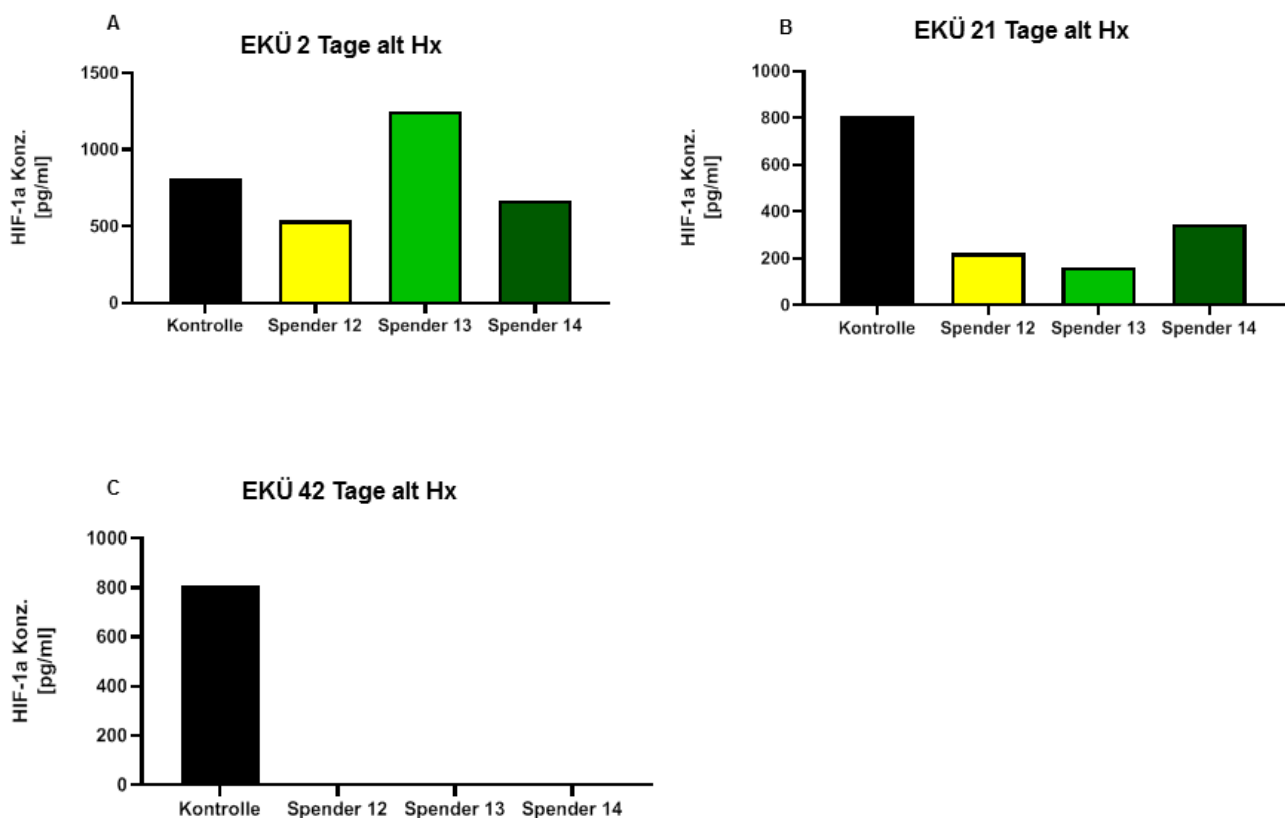


Abb.3. 28 Quantitative HIF-1 α Bestimmung in HepG2 Zellen nach Inkubation mit unterschiedlich alter EKÜs unter hypoxischen Bedingungen.

HepG2 Zellen wurden für 4 Stunden bei 37°C und hypoxischen Bedingungen (1% O₂) mit Überständen von EKs unterschiedlicher Spender inkubiert. Die Überstände wurden mittels Zentrifugation an Tag 2, 21 und 42 nach Abnahme gewonnen. Anschließend wurde mittels ELISA die HIF-1 α Konzentration der lysierten HepG2 Zellen bestimmt.

3.2.6. Detektion des Zytokin Gehaltes von Überständen frischer bzw. gealterten EKs

Um einen Überblick zu erlangen, ob und welche Zytokine sich in den Überständen der EKs befinden, nutzten wir einen Zytokin Array der Firma R&D. Mit dieser Methode war es uns möglich, in einem Array die Konzentration von 104 verschiedenen Proteinen in den unterschiedlich alten EKÜs zu messen. Bei der Auswertung konzentrierten wir uns auf proinflammatorische Zytokine und Entzündungsmarker, insbesondere CRP. Auch hier fiel ein deutlicher Unterschied zwischen den einzelnen Spendern auf. Exemplarisch für die Zytokin Arrays ist der Array des Spenders 12 dargestellt (Abb.3.29).

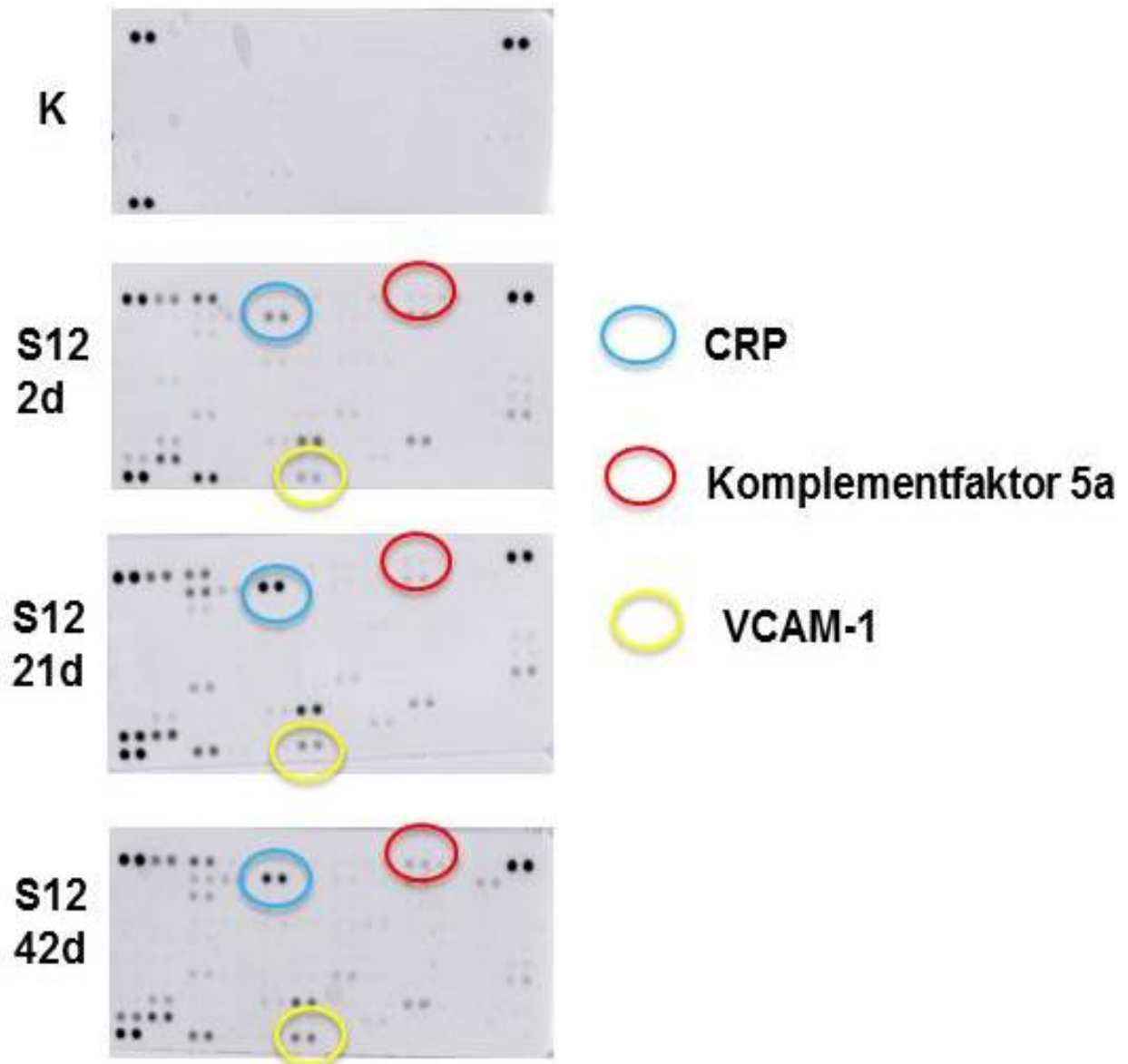


Abb.3. 29 Zytokin Gehalt von 2, 21 und 42 Tagen lang gelagerter EKs des Spenders 12.

Vom EK des Spenders 12 wurden für an Tag 2, 21 und 42 Proben entnommen, welche anschließend 2x für 45 Minuten bei 4000rpm und 4°C zentrifugiert wurden. Mittels Cytokin Proteome Profiler™-Array wurde die Konzentration bestimmter Zytokine in den entstandenen Überständen bestimmt. Als Kontrolle diente der im Kit enthaltenen Probenpuffer (Buffer no.6). Beispielhaft sind drei sich verändernde Zytokine markiert.

3.2.7. Detektion der CRP Sekretion von HepG2 Zellen nach Inkubation mit Überstand von frischen bzw. gealterten EKs

EKs verschiedener Spender wurden bis zu 42 Tage im Labor bei 4°C gelagert. An Tag 2, 21 sowie 42 wurden je 70ml abgenommen und 2-mal bei 4000 rpm und 4°C zentrifugiert. Mittels ELISA wurde die CRP Konzentration in den jeweiligen Überständen bestimmt. Alle Proben wiesen einen höheren CRP Gehalt als die Kontrolle auf, der sich bei allen Proben über die Zeit veränderte. Überstände der EKs der Spender 12, 14 und 17 wiesen an Tag 21 einen CRP Peak auf, bei Proben der Spender 15 und 16 sank der Wert an Tag 21 ab, stieg an Tag 42 wieder an und lag da über dem Ausgangswert an Tag 2. Da nicht genug Probenmaterial des Spenders 13 vorlag, konnten wir hier leider keinen ELISA durchführen (Abb.3.30).

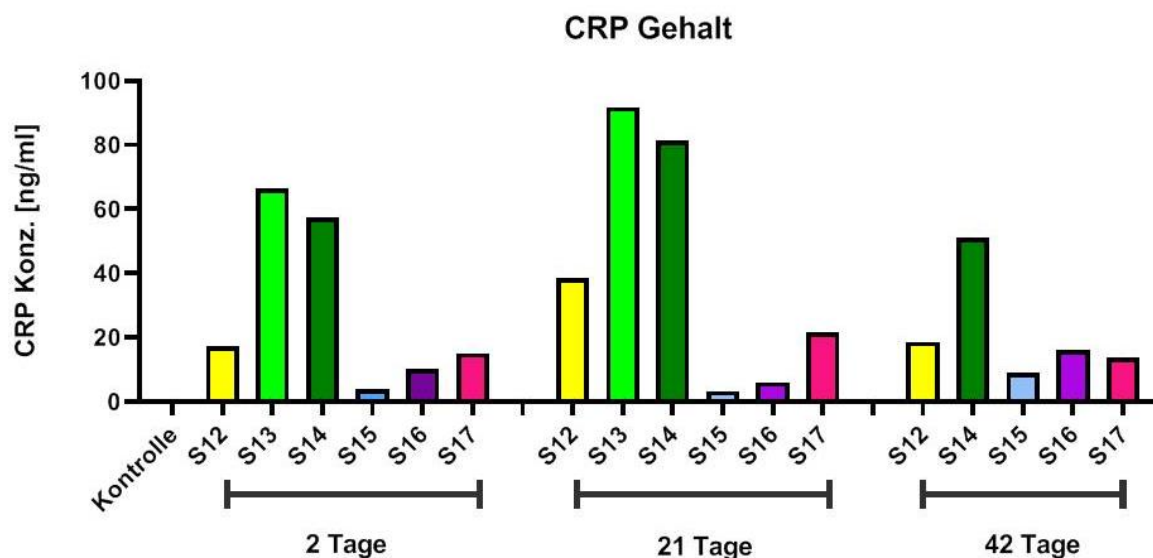


Abb.3. 30 CRP Konzentration in Überständen unterschiedlich lang gelagerter EKs.

EKs unterschiedlicher Spender wurden 42 Tagen gelagert. An Tag 2, 21 und 42 wurde durch 2 malige Zentrifugation bei 4°C und 4000rpm Überstand gewonnen. Mittels ELISA wurde die CRP Konzentration in den jeweiligen Überständen bestimmt. Aufgrund der geringen Probenmenge von Spender 13 konnten wir hier keinen ELISA durchführen. Konzentration in ng/ml, n=5

4. Diskussion

4.1. *In-vivo* Modell

In der Hepatologie sind größere chirurgische Eingriffe, vor allem der Eingriff der Teilhepatektomie, in den meisten Fällen verbunden mit einem nicht unerheblichen Blutverlust (Clevenger und Mallett, 2014). Dieser nimmt einen deutlichen Einfluss auf das Auftreten von Komplikationen wie postoperatives Leberversagen, perioperative Morbidität und Mortalität (Jarnagin et al., 2002).

In der vorliegenden Arbeit sollte zunächst näher untersucht werden, wie sich der Blutverlust auf die Regenerationsfähigkeit der Leber auswirkt. Es konnte gezeigt werden, dass im Rattenmodell die Proliferation der Hepatozyten durch einen Blutverlust gemindert und gleichzeitig verzögert wird. Dies ist an der reduzierten Anzahl und dem verzögerten Peak der BrdU positiven Zellen im histologischen Schnitt zu erkennen (Matot et al., 2017).

Der für die verzögerte Regeneration verantwortliche Mechanismus scheint ein gestörter Zellzyklus zu sein. In teilhepatektomierten Ratten, welche einen zusätzlichen Blutverlust erlitten (Blutverlust Gruppe), konnten Matot et al. 2017 im Lebergewebe mittels DNA-Microarray nachweisen, dass die Expression bestimmter Gene, die für den Übergang von der G1- in die S-Phase eine wichtige Rolle spielen, reduziert ist. Dies sind beispielsweise Cyclin a oder MCM6. Weiter ist die Expression von Genen, welche den Zellzyklus hemmen, wie Cdkn1a oder Cdkn1b erhöht. Eine Rekonstitution des Blutverlustes durch kolloide Lösungen zeigte keine Verbesserung der Regeneration nach einer PHx (Matot et al., 2017). Diese Ergebnisse zeigen also die Wichtigkeit der intraoperativen EK Transfusion während einer partiellen Hepatektomie, um den aufgetretenen Blutverlust auszugleichen.

Die hierfür im klinischen Bereich verwendeten EKs können bis zu 42 Tage gelagert werden. Während der Lagerung kommt es zu *storage lesions*: biochemischen, metabolischen und strukturellen Veränderungen der Erythrozyten. Ob die Lagerungsdauer von EKs den Regenerationsprozess der Leber beeinflusst, war ein weiteres Augenmerk der vorliegenden Arbeit.

Im Tiermodell zeigte sich, dass ein Blutverlust eine verstärkte Hypoxie im Lebergewebe hervorruft. Dies war in den Pimonidazol gefärbten Schnitten an der

verstärkten Rotbraunfärbung zu erkennen. Weiter zeigten unsere Genexpressionsanalysen mittels q-PCR, dass HIF-1 α sowie dessen Zielgene bei Ratten nach PHx und Blutverlust deutlich höher und länger exprimiert wurden, als bei Ratten der nur PHx Gruppe. Maeno und Kollegen konnten zeigen, dass die Hochregulation der HIF-1 α Expression nach einer PHx nach 24h ihren Peak erreicht (Maeno et al., 2005), durch den Blutverlust zusätzlich zur PHx war dieser in unserer Studie erst an Tag 4 post OP erreicht. Die stark ausgeprägte Hypoxie ist sehr wahrscheinlich zum einen durch eine hypovolämische Anämie zu erklären, zum anderen sinkt in verletztem bzw. entzündeten Gewebe der Sauerstoff- sowie der Glukosegehalt (Cramer und Johnson, 2003; Karhausen et al., 2005). Gibt man als Ausgleich für die Anämie bei Ratten frische, also am selben Tag entnommene EKs, so gleichen diese den hypoxischen Zustand aus, histologisch ist keine Hypoxie mehr nachweisbar. Gibt man ihnen allerdings EKs, die gealtert sind, so scheint der hypoxische Reiz nicht gemindert, sondern durch die alten EKs weiter verstärkt zu werden (Matot et al., 2013; Matot et al., 2017). Diesen Effekt kann man durch die morphologischen und biochemischen Veränderungen der EKs erklären, die im Laufe der Alterung auftreten. Durch erhöhte Rigidität und eine verstärkte Adhäsion an Endothelzellen wird die Fließeigenschaft der EKs gemindert. Ein erhöhter Laktatspiegel und erniedrigter pH-Wert sowie ein erniedrigter 2,3-DPG-Wert verändern die O₂ – Affinität. Weiter führt das freie Hämoglobin nach Reaktion mit Stickstoffmonoxid (NO) zu Vasokonstriktion. All diese Mechanismen können eine Ischämie und eine damit verbundene Hypoxie des Gewebes hervorrufen (Abb. 4.1.)

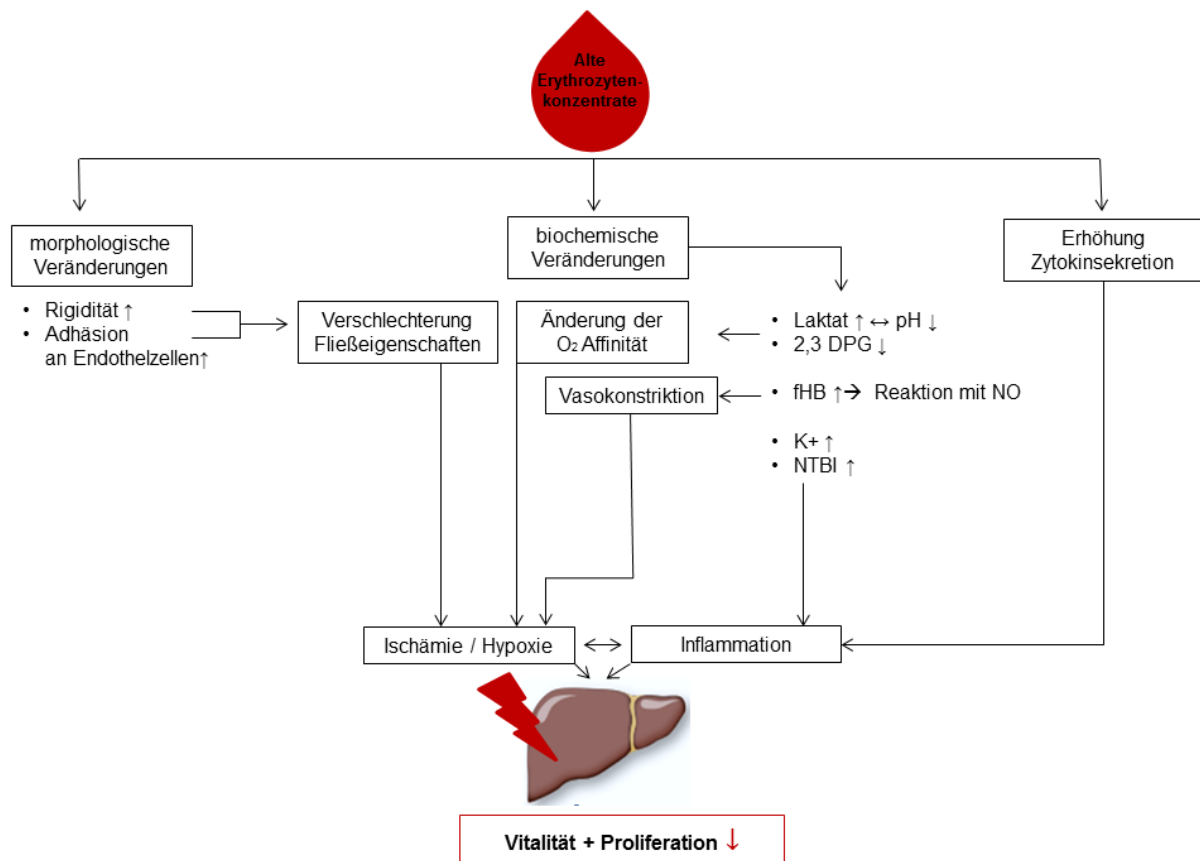


Abb. 4. 1 Schematische Darstellung der *storage lesions* auf die Vitalität und Proliferation von Lebergewebe nach PHx.

Durch morphologischen und biochemischen Veränderungen sowie eine Erhöhung der Zytokinsekretion werden Vitalität und Proliferation des Lebergewebes beeinflusst.

Es gibt zahlreiche Mechanismen des Organismus, sich an hypoxische Bedingungen anzupassen. Hierzu zählen neben kardiovaskulären und respiratorischen Mechanismen (Franke et al., 2013) auf zellulärer Ebene die Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren, wodurch es zu Änderungen in der Genexpression kommt. Eine zentrale Stellung nehmen hier HIFs und deren Zielgene ein (Fandrey und Gassmann, 2009).

Bei den Ratten, die durch den zugeführten Blutverlust eine gewisse Hypoxie erlitten, konnten wir eine Anpassung an die O₂- Unterversorgung im Gewebe nachweisen. So war die Expression von HIF-1α, HIF-2α, PGK1, Aldolase und EPO signifikant erhöht. Bei den Tieren, die zum Ausgleich des Blutverlustes gealterte EKs erhalten hatten und die histologisch eine Hypoxie aufwiesen, konnten wir diese Anpassungsmechanismen allerdings nicht beobachten. Lediglich die EPO

Expression war an POT 2 erhöht. Es konnte also gezeigt werden, dass bei der Ratte gealtertes Blut den Zellmechanismus zur Anpassung an hypoxische Bedingungen minimiert oder verhindert und somit die Regenerationsfähigkeit der Leber nach einer PHx mindert.

Einer der zugrunde liegende Pathomechanismus könnte hier die Hämolyse bedingte Erhöhung der Fe^{2+} Menge sein. Die HIF-1 α Hydroxilierung durch PHDs ist sowohl ein O_2 - als auch Fe^{2+} abhängiger Vorgang. Durch die erhöhte Fe^{2+} Menge in gealterten EKs könnte also eine verstärkte Hydroxilierung von HIF-1 α zu einer vermehrten Degradation des Hypoxie induzierbaren Faktors führen. Diese Annahme konnten wir im Rahmen dieser Arbeit nicht näher untersuchen, sie bedarf daher der weiteren Forschung.

4.2. Humanes *in-vitro* Modell

Um die Fragestellung in ein humanes in-vitro Modell zu übertragen, wählten wir mit HepG2, THP-1 und HPME Zellen Zelltypen, die am Regenerationsprozess der Leber beteiligt sind.

An HepG2 Zellen testeten wir mittels MTT-Assay, ob Überstände von EKs unterschiedlichen Alters Einfluss auf die Proliferation und Vitalität von humanen Hepatozyten haben. Es zeigte sich, dass es sowohl einen lagerungsdauerbedingten als auch konzentrationsabhängigen Einfluss gibt. Je konzentrierter der EKÜ war und je älter die EKs, desto weniger vital waren die Hepatozyten. Diesen Effekt führen wir vor allem auf die biochemischen Veränderungen in den gealterten EKs wie den erniedrigten pH- und 2,3 DPG-Wert sowie auf den erhöhten K^+ - Spiegel zurück. Hinsichtlich einer Veränderung in der Genexpression zeigten sich im humanen Zellmodell Parallelen zu den Reaktionen in der Leber der operierten Ratten. Auch im humanen Modell wurde, wenn auch weniger signifikant, die Anpassungsfähigkeit der HepG2 sowie HPME Zellen durch Inkubation mit EKÜs an hypoxische Bedingungen auf RNA Ebene verringert, hierbei spielte das Alter der EKÜs allerdings keine signifikante Rolle.

Für eine quantitative Bestimmung von HIF-1 α , inkubierten wir HepG2 Zellen für 4 Stunden unter normoxischen sowie hypoxischen Bedingungen mit den unterschiedlich alten EK Überständen der jeweiligen Spender. Mittels Immunoassays

bestimmten wir die HIF-1 α Konzentration. Unter normoxischen Bedingungen setzen alte EKs keinen hypoxischen Reiz, der HIF-1 α Gehalt war nach Inkubation nicht erhöht.

Betrachtet man die Akkumulation des HIF-1 α Proteins so konnten wir zeigen, dass alte EKÜs die Anpassungsfähigkeit von HepG2 Zellen an hypoxische Bedingungen vermindern. Sowohl mittels Western Blot als auch mittels ELISA konnten wir eine deutliche Abnahme des HIF-1 α Gehaltes durch alte EKÜs zeigen. Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen des Tiermodells, in dem wir ebenfalls eine Hemmung der zellulären Anpassungsfähigkeit an hypoxische Bedingungen zeigen konnten. Da wir diesen Effekt nicht auf RNA-Ebene beobachten konnten, gehen wir davon aus, dass sich dieser auf posttranslationaler Ebene abspielt. Auch hier könnte der erhöhte Gehalt an freiem Eisen, der mit Alterung der EKs zunimmt (siehe Tabelle 3.1) und eine damit verbundene Aktivierung von PHDs, welche HIF-1 α degradieren, eine Rolle spielen.

Neben der reduzierten Anpassung an die vorübergehenden hypoxischen Bedingungen spielt die inflammatorische Reaktion nach der PHx eine wichtige Rolle bei der Regeneration der Leber. Inflammatorische Zytokine wie IL-6 sind für die Initialisierung der Leberregeneration von entscheidender Bedeutung (Gilgenkrantz und Collin de l'hortet, 2011). In den verschiedenen humanen Zellsystemen wurde untersucht, inwieweit Überstände unterschiedlich alter EKs eine inflammatorische Reaktion hervorrufen. Durch den Nachweis der erhöhten IL-1 β Expression in Endothelzellen nach 24h Inkubation mit 42 Tage alten EKÜs konnten wir eine inflammatorische Aktivierung des Endothels durch gealterte EKs nachweisen. Durch eine Aktivierung kommt es unter anderem zu morphologischen Änderungen der Endothelzellen. Eine Kontraktion des Zytoskeletts der Endothelzellen sowie eine Störung der Zell-Zell Verbindungen führen zu einem Integrationsverlust des Zellverbandes (Castanares-Zapatero et al., 2013). Weiter ändert sich die Genexpression der Endothelzellen, es kommt zu einer verstärkten Expression von Adhäsionsmolekülen wie E-Selectin (Ledebur und Parks, 1995). Über einen mitogen-activated protein kinase- (MAPK) sowie nuclear-factor- κ B (NF κ B) Signalweg kommt es außerdem zu einer erhöhten Expression inflammatorischer Zytokine (Murphy et al., 2019).

Die Expression des Wachstumsfaktors ANG-2 wurde durch Inkubation mit Überständen gealterter EKs signifikant um das ca. 100-fache gesteigert. Durch ANG-2 erfolgt eine Destabilisierung des Endothels wodurch dieses für exogene Stimuli sensibilisiert wird (Fiedler und Augustin, 2006). Die erhöhte Expression von IL-1 β und ANG-2 könnte die verstärkt geschädigten (hypoxischen) Areale im Bereich der Zentralvene der operierten Rattenlebern erklären. Hu et al. beschrieben 2014, dass im Rahmen der Leberregeneration nach PHx die Endothelzellen der Leber ANG-2 dynamisch exprimieren. In einer ersten Phase, der Regenerationsphase der Hepatozyten wird ANG-2 nicht exprimiert, erst in der zweiten, der Angiogenese-phase erhöht sich die ANG-2 Expression (Hu et al., 2014). Die Hochregulation der ANG-2 Expression durch die Behandlung mit alten EKÜs könnte also auch dahingehend den Ablauf der Leberregeneration stören, dass ANG-2 in einer zu frühen Phase exprimiert wird.

Neben Hepatozyten und Endothelzellen kommen primär auch Zellen der angeborenen Immunität wie Monozyten, neutrophile Granulozyten oder Makrophagen mit transfundiertem Blut direkt in Kontakt. Am Modell der humanen monozytären Zelllinie THP-1 konnten keine signifikanten Einflüsse von EK-Überständen auf die Expression inflammatorischer Gene nachgewiesen werden. Diese Daten stehen im Widerspruch zu Arbeiten, die zeigen konnten, dass EKs altersabhängig zu einer Hochregulation von inflammatorischen Zytokine in primären Monozyten führten (Hod und Spitalnik, 2012; Danesh et al., 2014). Unpublizierte Daten unserer Kooperationspartner in Jerusalem konnten diese Hochregulation bestätigen. Schlussendlich mussten wir feststellen, dass THP-1 Zellen hinsichtlich unserer Fragestellung kein geeignetes Zellmodell sind.

Im Tiermodell zeigte sich, dass alte EKs langfristig eine Reduktion von Makrophagen im Gewebe bewirken. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der verringerten Expression von ICAM-1 im humanen *in-vitro* Modell. Durch eine reduzierte Expression von ICAM-1 wird das Protein dementsprechend reduziert sezerniert und die Diapedese von Leukozyten und damit wird der Austritt von Monozyten ins Gewebe reduziert.

Als ein großes Problem stellte sich die z.T. erhebliche Varianz zwischen den verschiedenen Spender EKs heraus. Neben unterschiedlich ausgeprägten Hämolysegraden und sehr unterschiedlichem Gehalt an Entzündungsparametern wie

CRP in den EK Überständen der verschiedenen Spendern, zeigte sich auch, dass die Beeinflussung der Expression verschiedener Gene wie EPO und IL-8 durch die unterschiedlich alten EKÜs zwischen den Spendern stark variiert. Wir konnten kein Muster der Suppression oder Induktion der Expression durch die EKÜs nachweisen. Unter anderem diese Ergebnisse brachten uns zu der Annahme, dass es deutliche spenderspezifische Faktoren mit Einfluss auf die EK Alterung gibt, deren Spezifizierung dringend weitere Untersuchung benötigt.

Dass wir diesen Effekt der Spenderspezifität nicht bei Ergebnissen der Tierversuche beobachten konnten, lässt sich durch die Homogenität der „Blutspender Tiere“ erklären. Bei allen Tieren handelte es sich um Labor-Inzuchtstämme des gleichen Geschlechts und Alters, alle erhielten das gleiche Futter und lebten unter pathogenfreien Standardbedingungen.

Ausgehend von den stark variierenden PCR-Daten wurden die EK Überstände verschiedener Spender mittels ProteomProfiler™ Zytokin Array analysiert. Es zeigten sich deutliche altersabhängige Unterschiede des Zytokingehaltes in den Überständen der verschiedenen Spender. Besonders fiel ein im Vergleich zur Kontrolle erhöhter CRP Gehalt in allen EKÜs auf. Mittels ELISA quantifizierten wir die CRP Konzentration. Es zeigte sich, dass sich der erhöhte Wert bei allen Spendern über die Lagerdauer veränderte. Zwar konnten wir den erhöhten CRP Wert sowie dessen Veränderung nachweisen, allerdings konnten wir bisher nicht den Ursprung des CRP innerhalb der EKs ermitteln.

Physiologischerweise wird CRP von Hepatozyten synthetisiert, ein marginaler Teil des CRPs kann aber auch von Monozyten und Lymphozyten gebildet werden (Kuta und Baum, 1986; Dong und Wright, 1996). Eine mögliche Erklärung des hohen CRP Wertes wäre daher die Synthese durch im EK verbliebene Leukozyten. Da der Grenzwert, der noch zulässige Residual Leukozytenzahl pro EK allerdings bei 1.000.000 liegt und diese Anzahl im Verhältnis zu den enorm hohen CRP Werten sehr gering ist, bedarf es weiterer Forschung nach dem CRP Synthese Ort in den EKs.

Der erhöhte CRP Wert in den EKs kann von klinischer Relevanz sein. CRP scheint in der Pathogenese der Transfusion Related Acute Lung Injury (TRALI) eine wichtige Rolle zu spielen und erhöhte CRP Werte scheinen die Entwicklung einer solchen TRALI zu fördern (Kapur et al., 2015; Kapur et al., 2016). Auch exogen zugeführtes

CRP hat diese Wirkung, wie Kapur und Kollegen 2015 in einem murinen Modell zeigen konnten (Kapur et al., 2016). Diese Ergebnisse passen zu den klinischen Studien, die einen Zusammenhang zwischen *storage lesions* und der Entwicklung einer TRALI zeigen (Silliman et al., 2014; Janz et al., 2013). Janz und Kollegen machen die im Medium akkumulierten Lipide für die Entstehung eines Lungenschadens nach einer Transfusion mitverantwortlich. Nach den Angaben von Kapur et al. und den Ergebnissen unserer Studie könnten die erhöhten CRP Werte aber ebenfalls einen Einfluss auf die Entstehung einer TRALI bei transfundierten Patienten haben.

Die Frage, inwieweit vergleichbare Pathomechanismen bei der reduzierten Regeneration der Leber nach PHx und Transfusion alter EKs eine Rolle spielen, bedarf weiterer Untersuchungen.

Insgesamt stellte uns die Übertragung der *in vivo* gewonnenen Ergebnisse aus dem Rattenmodell in ein humanes Modell wegen der spenderspezifische Unterschiede der EKs zum einen vor die Herausforderung, ein stabiles Modell zu entwickeln, welches den Einfluss der Alterung von EKs auf die humane Leberregeneration zuverlässig abbildet. Zum anderen wurde im Laufe der Untersuchungen klar, dass jedes EK anders altert und damit auf den Empfänger der Bluttransfusion hinsichtlich einer inflammatorischen Reaktion sehr unterschiedlichen Einfluss haben kann. Aktuell werden diesbezüglich keine Tests in der Transfusion-Routine durchgeführt. Deswegen bedarf es dringend weiterer Forschung, ein System zu entwickeln, mit dem sich die Lagerungsfähigkeit eines EKs möglichst schon direkt nach Abnahme testen lässt und der Alterungsgrad eines EKs kurz vor Transfusion nochmals verifiziert werden kann.

5. Literaturverzeichnis

1. Aiello, L. P., R. L. Avery, P. G. Arrigg, B. A. Keyt, H. D. Jampel, S. T. Shah, L. R. Pasquale, H. Thieme, M. A. Iwamoto, and J. E. Park. "Vascular Endothelial Growth Factor in Ocular Fluid of Patients with Diabetic Retinopathy and Other Retinal Disorders." *The New England Journal of Medicine* 331, no. 22 (December 1, 1994): 1480–87. doi:10.1056/NEJM199412013312203.
2. Almac, Emre, and Can Ince. "The Impact of Storage on Red Cell Function in Blood Transfusion." *Best Practice & Research. Clinical Anaesthesiology* 21, no. 2 (June 2007): 195–208.
3. Aubron, Cécile, Alistair Nichol, D. Jamie Cooper, und Rinaldo Bellomo. „Age of Red Blood Cells and Transfusion in Critically Ill Patients“. *Annals of Intensive Care* 3, Nr. 1 (15. Januar 2013): 2. <https://doi.org/10.1186/2110-5820-3-2>.
4. Auwerx, J. "The Human Leukemia Cell Line, THP-1: A Multifaceted Model for the Study of Monocyte-Macrophage Differentiation." *Experientia* 47, no. 1 (January 15, 1991): 22–31.
5. Babaev, Arkady, Federico Pozzi, Gregory Hare, und Haibo Zhang. „Storage of Red Blood Cells and Transfusion-Related Acute Lung Injury“. *Journal of Anesthesia & Critical Care: Open Access* 1, Nr. 1 (1. Januar 2014). <https://doi.org/10.15406/jaccoa.2014.01.00002>.
6. Bachmann, S., M. Le Hir, and K. U. Eckardt. "Co-Localization of Erythropoietin mRNA and Ecto-5'-Nucleotidase Immunoreactivity in Peritubular Cells of Rat Renal Cortex Indicates That Fibroblasts Produce Erythropoietin." *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society* 41, no. 3 (March 1993): 335–41.
7. Baffert, F. "Angiopoietin-1 Decreases Plasma Leakage by Reducing Number and Size of Endothelial Gaps in Venules." *AJP: Heart and Circulatory Physiology* 290, no. 1 (August 12, 2005): H107–18. doi:10.1152/ajpheart.00542.2005.
8. Baggiolini, M., und I. Clark-Lewis. „Interleukin-8, a Chemotactic and Inflammatory Cytokine“. *FEBS Letters* 307, Nr. 1 (27. Juli 1992): 97–101. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(92\)80909-z](https://doi.org/10.1016/0014-5793(92)80909-z).
9. Barash, Hila, Eitan Gross, Yifat Edrei, Orit Pappo, Gadi Spira, Israel Vlodavsky, Eithan Galun, Idit Matot, and Rinat Abramovitch. "Functional Magnetic Resonance Imaging Monitoring of Pathological Changes in Rodent Livers during Hyperoxia and Hypercapnia." *Hepatology (Baltimore, Md.)* 48, no. 4 (October 2008): 1232–41. <https://doi.org/10.1002/hep.22394>

10. Bell, G. I., C. F. Burant, J. Takeda, and G. W. Gould. "Structure and Function of Mammalian Facilitative Sugar Transporters." *The Journal of Biological Chemistry* 268, no. 26 (September 15, 1993): 19161–64.
11. Bella, J., P. R. Kolatkar, C. W. Marlor, J. M. Greve, and M. G. Rossmann. "The Structure of the Two Amino-Terminal Domains of Human ICAM-1 Suggests How It Functions as a Rhinovirus Receptor and as an LFA-1 Integrin Ligand." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, no. 8 (April 14, 1998): 4140–45.
12. Bennett-Guerrero, E., T. H. Veldman, A. Doctor, M. J. Telen, T. L. Ortel, T. S. Reid, M. A. Mulherin, et al. "Evolution of Adverse Changes in Stored RBCs." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, no. 43 (October 23, 2007): 17063–68. doi:10.1073/pnas.0708160104.
13. Berezina, Tamara L., Sergey B. Zaets, Claire Morgan, Charles R. Spillert, Mikio Kamiyama, Zoltan Spolarics, Edwin A. Deitch, und George W. Machiedo. „Influence of Storage on Red Blood Cell Rheological Properties“. *The Journal of Surgical Research* 102, Nr. 1 (Januar 2002): 6–
12. <https://doi.org/10.1006/jsre.2001.6306>.
14. Berridge, Michael V., Tan Ans, Mc Coy, Kathy D, and Wang, Rui. "The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays That Use Tetrazolium Salts." *Biochemica* 4 (1996): 14–19.
15. Brown, L. F., K. T. Yeo, B. Berse, T. K. Yeo, D. R. Senger, H. F. Dvorak, and L. van de Water. "Expression of Vascular Permeability Factor (vascular Endothelial Growth Factor) by Epidermal Keratinocytes during Wound Healing." *The Journal of Experimental Medicine* 176, no. 5 (November 1, 1992): 1375–79.
16. Bucher, N. L. "Liver Regeneration: An Overview." *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 6, no. 6 (December 1991): 615–24.
17. Castanares-Zapatero, Diego, Claire Bouleti, Caroline Sommereyns, Bernhard Gerber, Christelle Lecut, Thomas Mathivet, Michael Horckmans, et al. "Connection between Cardiac Vascular Permeability, Myocardial Edema, and Inflammation during Sepsis: Role of the α 1AMP-Activated Protein Kinase Isoform." *Critical Care Medicine* 41, no. 12 (December 2013): e411–22.
<https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e31829866dc>.
18. Chanput, Wasaporn, Jurriaan J. Mes, and Harry J. Wichers. "THP-1 Cell Line: An in Vitro Cell Model for Immune Modulation Approach." *International Immunopharmacology* 23, no. 1 (November 2014): 37–45.
doi:10.1016/j.intimp.2014.08.002.

19. Chin-Yee, I., N. Arya, und M. S. d'Almeida. „The Red Cell Storage Lesion and Its Implication for Transfusion“. *Transfusion Science* 18, Nr. 3 (September 1997): 447–58. [https://doi.org/10.1016/S0955-3886\(97\)00043-X](https://doi.org/10.1016/S0955-3886(97)00043-X).
20. Clevenger, Ben, and Susan V. Mallett. “Transfusion and Coagulation Management in Liver Transplantation.” *World Journal of Gastroenterology: WJG* 20, no. 20 (May 28, 2014): 6146–58. doi:10.3748/wjg.v20.i20.6146.
21. Cramer, Thorsten, and Randall S. Johnson. “A Novel Role for the Hypoxia Inducible Transcription Factor HIF-1alpha: Critical Regulation of Inflammatory Cell Function.” *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 2, no. 3 (June 2003): 192–93.
22. Dalby, A. R., D. R. Tolan, and J. A. Littlechild. “The Structure of Human Liver Fructose-1,6-Bisphosphate Aldolase.” *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography* 57, no. Pt 11 (November 2001): 1526–33.
23. Dame, C., H. Fahnenstich, P. Freitag, D. Hofmann, T. Abdul-Nour, P. Bartmann, and J. Fandrey. “Erythropoietin mRNA Expression in Human Fetal and Neonatal Tissue.” *Blood* 92, no. 9 (November 1, 1998): 3218–25.
24. Dancygier, Henryk, und Hans-Dieter Allescher. *Klinische Hepatologie: Grundlagen, Diagnostik und Therapie hepatobiliärer Erkrankungen ; mit 257 Tabellen*. Berlin: Springer, 2003.
25. Danesh, Ali, Heather C. Inglis, Rachael P. Jackman, Shiquan Wu, Xutao Deng, Marcus O. Muench, John W. Heitman, and Philip J. Norris. “Exosomes from Red Blood Cell Units Bind to Monocytes and Induce Proinflammatory Cytokines, Boosting T-Cell Responses in Vitro.” *Blood* 123, no. 5 (January 30, 2014): 687–96. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-10-530469>.
26. derangedphysiology.com, 2015
<http://www.derangedphysiology.com/main/required-reading/haematology-and-oncology/Chapter%203.0.4/storage-lesions-banked-red-blood-cells>
(retrieved: July 1, 2017)
27. Desjardins, Philippe, and Deborah Conklin. “NanoDrop Microvolume Quantitation of Nucleic Acids.” *Journal of Visualized Experiments*, no. 1 (November 22, 2010). doi:10.3791/2565.
28. Dinarello, C. A. “Interleukin-1 and Interleukin-1 Antagonism.” *Blood* 77, no. 8 (April 15, 1991): 1627–52.
29. Dinarello, Charles A. “Blocking IL-1 in Systemic Inflammation.” *The Journal of Experimental Medicine* 201, no. 9 (May 2, 2005): 1355–59. doi:10.1084/jem.20050640.

30. Dong, Q., und J. R. Wright. „Expression of C-Reactive Protein by Alveolar Macrophages“. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 156, Nr. 12 (15. Juni 1996): 4815–20.
31. Dinarello, Charles A., and Jos W. M. van der Meer. “Treating Inflammation by Blocking Interleukin-1 in Humans.” *Seminars in Immunology* 25, no. 6 (December 15, 2013): 469–84. doi:10.1016/j.smim.2013.10.008.
32. Duscher, Dominik, Michael Januszyk, Zeshaan N. Maan, Alexander J. Whittam, Michael S. Hu, Graham G. Walmsley, Yixiao Dong, Sacha M. Khong, Michael T. Longaker, and Geoffrey C. Gurtner. “Comparison of the Hydroxylase Inhibitor Dimethyloxalylglycine and the Iron Chelator Deferoxamine in Diabetic and Aged Wound Healing.” *Plastic and Reconstructive Surgery* 139, no. 3 (March 2017): 695e–706e. <https://doi.org/10.1097/PRS.0000000000003072>.
33. Elvidge, Gareth P., Louisa Glenny, Rebecca J. Appelhoff, Peter J. Ratcliffe, Jiannis Ragoussis, and Jonathan M. Gleadle. “Concordant Regulation of Gene Expression by Hypoxia and 2-Oxoglutarate-Dependent Dioxygenase Inhibition: The Role of HIF-1alpha, HIF-2alpha, and Other Pathways.” *The Journal of Biological Chemistry* 281, no. 22 (June 2, 2006): 15215–26. <https://doi.org/10.1074/jbc.M511408200>.
34. Erslev, Allan J., and Thomas G. Gabuzda. *Pathophysiology of Blood*. 3rd ed. Philadelphia: Saunders, 1985.
35. Eurotransplant, annual Report 2015, https://www.eurotransplant.org/cms/mediaobject.php?file=AR_ET_2015.pdf
36. Fabriek, Babs O., Machteld M. J. Polfliet, Rianka P. M. Vloet, Roel C. van der Schors, Antoon J. M. Ligtenberg, Lehn K. Weaver, Christiaan Geest, et al. “The Macrophage CD163 Surface Glycoprotein Is an Erythroblast Adhesion Receptor.” *Blood* 109, no. 12 (June 15, 2007): 5223–29. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-08-036467>.
37. Fandrey, Joachim, Thomas A. Gorr, and Max Gassmann. “Regulating Cellular Oxygen Sensing by Hydroxylation.” *Cardiovascular Research* 71, no. 4 (September 1, 2006): 642–51. doi:10.1016/j.cardiores.2006.05.005.
38. Fandrey und Gassmann, International Society of Arterial Chemoreception, Editor: Constancio Gonzalez, Colin A. Nurse, and C. Peers, eds. *Arterial Chemoreceptors*. Advances in Experimental Medicine and Biology, v. 648. Dordrecht Springer, 2009, S.197- 206
39. Feinberg, A. P., and B. Vogelstein. “A Technique for Radiolabeling DNA Restriction Endonuclease Fragments to High Specific Activity.” *Analytical Biochemistry* 132, no. 1 (July 1, 1983): 6–13.

40. Ferenčik, Miroslav, Hrsg. *Wörterbuch Allergologie und Immunologie: Fachbegriffe, Personen und klinische Daten von A - Z ; [mit CD-ROM]*. SpringerMedizin. Wien: Springer, 2005.
41. Ferenčik, Miroslav, und Katarína Zervan, Hrsg. *Kompendium der Immunologie: Grundlagen und Klinik*. Wien: Springer, 2006.
42. Ferrara, N., and W. J. Henzel. "Pituitary Follicular Cells Secrete a Novel Heparin-Binding Growth Factor Specific for Vascular Endothelial Cells." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 161, no. 2 (June 15, 1989): 851–58.
43. Ferrara, N. "Vascular Endothelial Growth Factor." *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 29, no. 6 (June 2009): 789–91. doi:10.1161/ATVBAHA.108.179663.
44. Ferrara, N., K. Carver-Moore, H. Chen, M. Dowd, L. Lu, K. S. O'Shea, L. Powell-Braxton, K. J. Hillan, and M. W. Moore. "Heterozygous Embryonic Lethality Induced by Targeted Inactivation of the VEGF Gene." *Nature* 380, no. 6573 (April 4, 1996): 439–42. doi:10.1038/380439a0.
45. Fiedler, Ulrike, Marion Scharpfenecker, Stefanie Koidl, Anja Hegen, Verena Grunow, Jarno M. Schmidt, Wilhelm Kriz, Gavin Thurston, and Hellmut G. Augustin. "The Tie-2 Ligand Angiopoietin-2 Is Stored in and Rapidly Released upon Stimulation from Endothelial Cell Weibel-Palade Bodies." *Blood* 103, no. 11 (June 1, 2004): 4150–56. doi:10.1182/blood-2003-10-3685.
46. Franke Kristin, Max Gassmann, and Ben Wielockx. "Erythrocytosis: The HIF Pathway in Control." *Blood* 122, no. 7 (August 15, 2013): 1122–28. doi:10.1182/blood-2013-01-478065.
47. Frede, Stilla, Uta Berchner-Pfannschmidt, and Joachim Fandrey. "Regulation of Hypoxia-Inducible Factors during Inflammation." *Methods in Enzymology* 435 (2007): 405–19. doi:10.1016/S0076-6879(07)35021-0.
48. Frede, Stilla and Fandrey, Joachim „Cellular and Molecular Defenses Against Hypoxia“ Chapter 2 in: „High Altitude: Human Adaption to Hypoxia“, Eds: Swenson, Erik and Bärtsch, Peter, Springer Verlag, 2.Edition, 2013
49. Fiedler, Ulrike, and Hellmut G. Augustin. "Angiopoietins: A Link between Angiogenesis and Inflammation." *Trends in Immunology* 27, no. 12 (December 2006): 552–58. doi:10.1016/j.it.2006.10.004.
50. Gan, Stephanie D., und Kruti R. Patel. „Enzyme Immunoassay and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay“. *The Journal of Investigative Dermatology* 133, Nr. 9 (September 2013): e12. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.287>.

51. Ganong, William Francis, and Wilhelm Auerswald. *Lehrbuch der medizinischen Physiologie: die Physiologie des Menschen für Studierende der Medizin und Ärzte ; mit 158 Tabellen*. 4., überarb. Aufl. Berlin: Springer, 1979.
52. Gilgenkrantz, H., and A. Collin de l'Hortet. "New Insights into Liver Regeneration." *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology* 35, no. 10 (October 2011): 623–29. doi:10.1016/j.clinre.2011.04.002.
53. Grundmann, Reinhart, and Pichlmaier, Heinz. "Leberresektion - Indikationen, Möglichkeiten und Ergebnisse." *Deutsches Ärzteblatt* 7, no. A (February 18, 1983): 50–60.
54. Häring, Hans-Ulrich, und Ferruh Hâdi Artunç, Hrsg. *Diabetologie in Klinik und Praxis: 195 Tabellen*. 6., Vollst. überarb. und erw. Aufl. Stuttgart: Thieme, 2011.
55. Hattangadi, Shilpa M., Piu Wong, Lingbo Zhang, Johan Flygare, and Harvey F. Lodish. "From Stem Cell to Red Cell: Regulation of Erythropoiesis at Multiple Levels by Multiple Proteins, RNAs, and Chromatin Modifications." *Blood* 118, no. 24 (December 8, 2011): 6258–68. doi:10.1182/blood-2011-07-356006.
56. Heinrich, Peter C., Matthias Müller, und Lutz Graeve, Hrsg. *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*. Springer-Lehrbuch. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2014. Kapitel 70 (Siegfried Ansorge und Michael Träger) „Immunologie“, Seite 898 <https://doi.org/10.1007/978-3-642-17972-3>
57. Higgins GM, Anderson RM: Experimental pathology of the liver. I Restoration of liver of white rat following partial surgical removal. *AMA Arch Pathol* 12:186–202, 1931
58. Hill, D. B., L. S. Marsano, und C. J. McClain. „Increased Plasma Interleukin-8 Concentrations in Alcoholic Hepatitis“. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 18, Nr. 3 (September 1993): 576–80.
59. Hod, E. A., and S. L. Spitalnik. "Stored Red Blood Cell Transfusions: Iron, Inflammation, Immunity, and Infection." *Transfusion Clinique Et Biologique: Journal De La Societe Francaise De Transfusion Sanguine* 19, no. 3 (June 2012): 84–89. <https://doi.org/10.1016/j.tracli.2012.04.001>.
60. Hoffbrand, Allan V., and Nicola Gökbüget, eds. *Grundkurs Hämatologie: mit 123 Tabellen*. 2., Aktualisierte und erw. Aufl. Ex libris 5. Berlin: Blackwell, 2003.
61. Hoffmann, Elke, Oliver Dittrich-Breiholz, Helmut Holtmann, und Michael Kracht. „Multiple Control of Interleukin-8 Gene Expression“. *Journal of Leukocyte Biology* 72, Nr. 5 (November 2002): 847–55.
62. Hovav, T., S. Yedgar, N. Manny, and G. Barshtein. "Alteration of Red Cell Aggregability and Shape during Blood Storage." *Transfusion* 39, no. 3 (March 1999): 277–81.

63. Hu, J., K. Srivastava, M. Wieland, A. Runge, C. Mogler, E. Besemfelder, D. Terhardt, et al. "Endothelial Cell-Derived Angiopoietin-2 Controls Liver Regeneration as a Spatiotemporal Rheostat." *Science* 343, no. 6169 (January 24, 2014): 416–19. <https://doi.org/10.1126/science.1244880>.
64. Hunt, B. J., and K. M. Jurd. "Endothelial Cell Activation. A Central Pathophysiological Process." *BMJ (Clinical Research Ed.)* 316, no. 7141 (May 2, 1998): 1328–29. <https://doi.org/10.1136/bmj.316.7141.1328>.
65. Jansohn, Monika. "Gentechnische Methoden – eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor", Elsevier Verlag, 4.Auflage, 2007, Kapitel 5, T.Bangsow, U.Deutsch, H.Engel, C.Korfhage, D.Löffert, „verschiedene PCR-Techniken“, S.153-173
66. Janz, David R., Zhiguo Zhao, Tatsuki Koyama, Addison K. May, Gordon R. Bernard, Julie A. Bastarache, Pampee P. Young, und Lorraine B. Ware. „Longer Storage Duration of Red Blood Cells Is Associated with an Increased Risk of Acute Lung Injury in Patients with Sepsis“. *Annals of Intensive Care* 3, Nr. 1 (24. September 2013): 33. <https://doi.org/10.1186/2110-5820-3-33>.
67. Jarnagin, William R., Mithat Gonen, Yuman Fong, Ronald P. DeMatteo, Leah Ben-Porat, Sarah Little, Carlos Corvera, Sharon Weber, und Leslie H. Blumgart. „Improvement in Perioperative Outcome after Hepatic Resection: Analysis of 1,803 Consecutive Cases over the Past Decade“. *Annals of Surgery* 236, Nr. 4 (Oktober 2002): 397-406; discussion 406-407. <https://doi.org/10.1097/01.SLA.0000029003.66466.B3>.
68. Jelkmann, W. "Erythropoietin: Structure, Control of Production, and Function." *Physiological Reviews* 72, no. 2 (April 1992): 449–89.
69. Jelkmann, Wolfgang. "Physiology and Pharmacology of Erythropoietin." *Transfusion Medicine and Hemotherapy* 40, no. 5 (2013): 302–9. doi:10.1159/000356193.
70. Jiang, Wen G., Hrsg. *Growth Factors and Their Receptors in Cancer Metastasis*. Cancer Metastasis 2. Dordrecht: Kluwer Acad. Publ, 2001. T.A.Martin, Kapitel 3, S.51-56,
71. Kajdaniuk, Dariusz, Bogdan Marek, Halina Borgiel-Marek, and Beata Kos-Kudła. "Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) - Part 1: In Physiology and Pathophysiology." *Endokrynologia Polska* 62, no. 5 (2011): 444–55.
72. Kapur, Rick, Michael Kim, Shanjeevan Shanmugabhavananthan, Jonathan Liu, Yuan Li, und John W. Semple. „C-Reactive Protein Enhances Murine Antibody-Mediated Transfusion-Related Acute Lung Injury“. *Blood* 126, Nr. 25 (17. Dezember 2015): 2747–51. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-09-672592>.

73. Kapur, Rick, Michael Kim, Matthew T. Rondina, Leendert Porcelijn, und John W. Semple. „Elevation of C-Reactive Protein Levels in Patients with Transfusion-Related Acute Lung Injury“. *Oncotarget* 7, Nr. 47 (22. November 2016): 78048–54. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12872>.
74. Karhausen, Jörn, Volker H. Haase, and Sean P. Colgan. “Inflammatory Hypoxia: Role of Hypoxia-Inducible Factor.” *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 4, no. 2 (February 2005): 256–58.
75. Karkkainen, M. J., and T. V. Petrova. “Vascular Endothelial Growth Factor Receptors in the Regulation of Angiogenesis and Lymphangiogenesis.” *Oncogene* 19, no. 49 (November 20, 2000): 5598–5605. doi:10.1038/sj.onc.1203855.
76. Kasahara, M., and P. C. Hinkle. “Reconstitution and Purification of the D-Glucose Transporter from Human Erythrocytes.” *The Journal of Biological Chemistry* 252, no. 20 (October 25, 1977): 7384–90.
77. Kahn, B. B. “Facilitative Glucose Transporters: Regulatory Mechanisms and Dysregulation in Diabetes.” *The Journal of Clinical Investigation* 89, no. 5 (May 1992): 1367–74. doi:10.1172/JCI115724.
78. Kiefel, Volker, and Christian Mueller-Eckhardt, eds. *Transfusionsmedizin und Immunhämatologie: Grundlagen - Therapie - Methodik*. 4., Überarb. und erw. Aufl. Berlin: Springer Medizin, 2010.
79. Knowles, B. B., C. C. Howe, and D. P. Aden. “Human Hepatocellular Carcinoma Cell Lines Secrete the Major Plasma Proteins and Hepatitis B Surface Antigen.” *Science (New York, N. Y.)* 209, no. 4455 (July 25, 1980): 497–99.7
80. Koch, Colleen Gorman, Liang Li, Daniel I. Sessler, Priscilla Figueroa, Gerald A. Hoeltge, Tomislav Mihaljevic, und Eugene H. Blackstone. „Duration of Red-Cell Storage and Complications after Cardiac Surgery“. *The New England Journal of Medicine* 358, Nr. 12 (20. März 2008): 1229–39. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa070403>.
81. Kretz, Franz-Josef, Frank Teufel, and Kretz-Teufel, eds. *Anästhesie und Intensivmedizin: mit 137 Tabellen*. Heidelberg: Springer, 2006.
82. Krump-Konvalinkova, V., F. Bittinger, R. E. Unger, K. Peters, H. A. Lehr, and C. J. Kirkpatrick. “Generation of Human Pulmonary Microvascular Endothelial Cell Lines.” *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology* 81, no. 12 (December 2001): 1717–27.
83. Kuta, A. E., und L. L. Baum. „C-Reactive Protein Is Produced by a Small Number of Normal Human Peripheral Blood Lymphocytes“. *The Journal of Experimental Medicine* 164, Nr. 1 (1. Juli 1986): 321–26.
84. Lando, David, Daniel J. Peet, Jeffrey J. Gorman, Dean A. Whelan, Murray L. Whitelaw, and Richard K. Bruick. “FIH-1 Is an Asparaginyl Hydroxylase Enzyme That Regulates the Transcriptional Activity of Hypoxia-Inducible Factor.” *Genes & Development* 16, no. 12 (June 15, 2002): 1466–71. doi:10.1101/gad.991402

85. Lang, Florian, Robert F Schmidt, and Gerhard Thews. *Physiologie des Menschen: mit Pathophysiologie ; mit 78 Tabellen ; [neue Approbationsordnung]*. Berlin, Heidelberg: Springer Medizin Verlag Heidelberg, 2005.
<http://dx.doi.org/10.1007/b137547>.
86. Lappin, Terence R., A. Peter Maxwell, and Patrick G. Johnston. "EPO's Alter Ego: Erythropoietin Has Multiple Actions." *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 20, no. 6 (2002): 485–92. doi:10.1634/stemcells.20-6-485.
87. Ledebur, H. C., and T. P. Parks. "Transcriptional Regulation of the Intercellular Adhesion Molecule-1 Gene by Inflammatory Cytokines in Human Endothelial Cells. Essential Roles of a Variant NF-Kappa B Site and p65 Homodimers." *The Journal of Biological Chemistry* 270, no. 2 (January 13, 1995): 933–43.
<https://doi.org/10.1074/jbc.270.2.933>.
88. Leung, D. W., G. Cachianes, W. J. Kuang, D. V. Goeddel, and N. Ferrara. "Vascular Endothelial Growth Factor Is a Secreted Angiogenic Mitogen." *Science (New York, N.Y.)* 246, no. 4935 (December 8, 1989): 1306–9.
89. Levy, Andrew P., Nina S. Levy, Scott Wegner, and Mark A. Goldberg. "Transcriptional Regulation of the Rat Vascular Endothelial Growth Factor Gene by Hypoxia." *Journal of Biological Chemistry* 270, no. 22 (June 2, 1995): 13333–40.
doi:10.1074/jbc.270.22.13333.
90. Lin, Alice V. „Indirect ELISA“. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 1318 (2015): 51–59. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2742-5_5.
91. Loike, J. D., L. Cao, J. Brett, S. Ogawa, S. C. Silverstein, and D. Stern. "Hypoxia Induces Glucose Transporter Expression in Endothelial Cells." *The American Journal of Physiology* 263, no. 2 Pt 1 (August 1992): C326–33.
92. Maeno, Hiroshi, Takashi Ono, Dipok Kumar Dhar, Takashi Sato, Akira Yamanoi, and Naofumi Nagasue. "Expression of Hypoxia Inducible Factor-1alpha during Liver Regeneration Induced by Partial Hepatectomy in Rats." *Liver International: Official Journal of the International Association for the Study of the Liver* 25, no. 5 (October 2005): 1002–9. doi:10.1111/j.1478-3231.2005.01144.x.
93. Mahon, P. C., K. Hirota, and G. L. Semenza. "FIH-1: A Novel Protein That Interacts with HIF-1alpha and VHL to Mediate Repression of HIF-1 Transcriptional Activity." *Genes & Development* 15, no. 20 (October 15, 2001): 2675–86.
doi:10.1101/gad.924501.7
94. Maisonpierre, P. C., C. Suri, P. F. Jones, S. Bartunkova, S. J. Wiegand, C. Radziejewski, D. Compton, et al. "Angiopoietin-2, a Natural Antagonist for Tie2 That Disrupts in Vivo Angiogenesis." *Science (New York, N.Y.)* 277, no. 5322 (July 4, 1997): 55–60.

95. Mankan, A. K., A. Kubarenko, and V. Hornung. "Immunology in Clinic Review Series; Focus on Autoinflammatory Diseases: Inflammasomes: Mechanisms of Activation." *Clinical and Experimental Immunology* 167, no. 3 (March 2012): 369–81. doi:10.1111/j.1365-2249.2011.04534.x.
96. Manthey, Helga D., Trent M. Woodruff, Stephen M. Taylor, und Peter N. Monk. „Complement Component 5a (C5a)“. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 41, Nr. 11 (November 2009): 2114–
17. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2009.04.005>.
97. Matot, Idit, Miriam Katz, Orit Pappo, Orly Zelig, Nathalie Corchia, Shaul Yedgar, Gregory Barshtein, Elliot Bennett Guerrero, and Rinat Abramovitch. "Resuscitation With Aged Blood Exacerbates Liver Injury in a Hemorrhagic Rat Model*." *Critical Care Medicine* 41, no. 3 (March 2013): 842–49. doi:10.1097/CCM.0b013e3182711b38.
98. Matot, Idit, Nathalie Nachmansson, Omri Duev, Susanne Schulz, Katrin Schroeder-Stein, Stilla Frede, und Rinat Abramovitch. „Impaired Liver Regeneration after Hepatectomy and Bleeding Is Associated with a Shift from Hepatocyte Proliferation to Hypertrophy“. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 31, Nr. 12 (Dezember 2017): 5283–
95. <https://doi.org/10.1096/fj.201700153R>.
99. Maxwell, P. H., M. S. Wiesener, G. W. Chang, S. C. Clifford, E. C. Vaux, M. E. Cockman, C. C. Wykoff, C. W. Pugh, E. R. Maher, and P. J. Ratcliffe. "The Tumour Suppressor Protein VHL Targets Hypoxia-Inducible Factors for Oxygen-Dependent Proteolysis." *Nature* 399, no. 6733 (May 20, 1999): 271–75. doi:10.1038/20459
100. Mizel, S. B. "The Interleukins." *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 3, no. 12 (October 1989): 2379–88.
101. Mole, David R., Christine Blancher, Richard R. Copley, Patrick J. Pollard, Jonathan M. Gleadle, Jiannis Ragoussis, and Peter J. Ratcliffe. "Genome-Wide Association of Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-1 α and HIF-2 α DNA Binding with Expression Profiling of Hypoxia-Inducible Transcripts." *The Journal of Biological Chemistry* 284, no. 25 (June 19, 2009): 16767–75. doi:10.1074/jbc.M901790200.
102. Mosmann, T. "Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays." *Journal of Immunological Methods* 65, no. 1–2 (December 16, 1983): 55–63.
103. Mueckler, M., C. Caruso, S. A. Baldwin, M. Panico, I. Blench, H. R. Morris, W. J. Allard, G. E. Lienhard, and H. F. Lodish. "Sequence and Structure of a Human Glucose Transporter." *Science (New York, N.Y.)* 229, no. 4717 (September 6, 1985): 941–45.
104. Mueckler, M. "Facilitative Glucose Transporters." *European Journal of Biochemistry / FEBS* 219, no. 3 (February 1, 1994): 713–25.

105. Murphy, James M., Kyuho Jeong, Yelitza A. R. Rodriguez, Jung-Hyun Kim, Eun-Young Erin Ahn, and Ssang-Taek Steve Lim. "FAK and Pyk2 Activity Promote TNF- α and IL-1 β -Mediated pro-Inflammatory Gene Expression and Vascular Inflammation." *Scientific Reports* 9, no. 1 (May 20, 2019): 7617. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44098-2>.
106. Muster Arbeits-anweisung zur Transfusion von Erythrozytenkonzentraten, Bundesärztekammer Stand 2019; <http://www.bundesaerztekammer.de/aerzte/medizin-ethik/wissenschaftlicher-beirat/veroeffentlichungen/haemotherapie-transfusionsmedizin/richtlinie/>
107. Ollero, Mario, and Djillali Sahali. "Inhibition of the VEGF Signalling Pathway and Glomerular Disorders." *Nephrology, Dialysis, Transplantation: Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 30, no. 9 (September 2015): 1449–55. doi:10.1093/ndt/gfu368.
108. Tajima, Toshihide, Nobuhito Goda, Natsuko Fujiki, Takako Hishiki, Yasumasa Nishiyama, Nanami Senoo-Matsuda, Motohide Shimazu, et al. "HIF-1 α Is Necessary to Support Gluconeogenesis during Liver Regeneration." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 387, no. 4 (October 2, 2009): 789–94. doi:10.1016/j.bbrc.2009.07.115.
109. Neufeld, G., T. Cohen, S. Gengrinovitch, and Z. Poltorak. "Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptors." *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 13, no. 1 (January 1999): 9–22.
110. Oczenski, Wolfgang, Harald Andel, and Alois Werba. *Atmen, Atemhilfen: Atemphysiologie und Beatmungstechnik*. 9., überarb. und erw. Aufl. Stuttgart: Thieme, 2012.
111. Oe, Shoshiro, Eric R. Lemmer, Elizabeth A. Conner, Valentina M. Factor, Per Levéen, Jonas Larsson, Stefan Karlsson, and Snorri S. Thorgeirsson. "Intact Signaling by Transforming Growth Factor Beta Is Not Required for Termination of Liver Regeneration in Mice." *Hepatology (Baltimore, Md.)* 40, no. 5 (November 2004): 1098–1105. doi:10.1002/hep.20426.
112. Oh, H., H. Takagi, K. Suzuma, A. Otani, M. Matsumura, and Y. Honda. "Hypoxia and Vascular Endothelial Growth Factor Selectively up-Regulate Angiopoietin-2 in Bovine Microvascular Endothelial Cells." *The Journal of Biological Chemistry* 274, no. 22 (May 28, 1999): 15732–39.
113. Parikh, Samir M., Tadanori Mammoto, Aylit Schultz, Hai-Tao Yuan, David Christiani, S. Ananth Karumanchi, and Vikas P. Sukhatme. "Excess Circulating Angiopoietin-2 May Contribute to Pulmonary Vascular Leak in Sepsis in Humans." *PLoS Medicine* 3, no. 3 (March 2006): e46. doi:10.1371/journal.pmed.0030046.
114. Pathak, Samir, Abdul Hakeem, Thomas Pike, Giles J. Toogood, Matthew Simpson, K. Raj Prasad, and Danilo Miskovic. "Anaesthetic and Pharmacological Techniques to Decrease Blood Loss in Liver Surgery: A Systematic Review." *ANZ Journal of Surgery* 85, no. 12 (December 2015): 923–30. doi:10.1111/ans.13195.

115. Pfaffl, Michael Walter, Lehrstuhl für Physiologie, Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, and Landnutzung & Umwelt, Freising. "Real-Time RT-PCR: Neue Ansätze Zur Exakten mRNA Quantifizierung." *BIOspektrum*, no. 1/04 (2004): 92–95.
116. Plate, K. H., G. Breier, H. A. Weich, and W. Risau. "Vascular Endothelial Growth Factor Is a Potential Tumour Angiogenesis Factor in Human Gliomas in Vivo." *Nature* 359, no. 6398 (October 29, 1992): 845–48. doi:10.1038/359845a0.
117. Qu, Lirong, and Darrell J. Triulzi. "Clinical Effects of Red Blood Cell Storage." *Cancer Control: Journal of the Moffitt Cancer Center* 22, no. 1 (January 2015): 26–37.
118. Ramos, Theresa N., Daniel C. Bullard, and Scott R. Barnum. "ICAM-1: Isoforms and Phenotypes." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 192, no. 10 (May 15, 2014): 4469–74. doi:10.4049/jimmunol.1400135.
119. Relevy, Hanna, Alexander Koshkaryev, Noga Manny, Saul Yedgar, and Gregory Barshtein. "Blood Banking-Induced Alteration of Red Blood Cell Flow Properties." *Transfusion* 48, no. 1 (January 2008): 136–46. doi:10.1111/j.1537-2995.2007.01491.x.
120. Roberts, A. B., K. C. Flanders, U. I. Heine, S. Jakowlew, P. Kondaiah, S. J. Kim, und M. B. Sporn. „Transforming Growth Factor-Beta: Multifunctional Regulator of Differentiation and Development“. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 327, Nr. 1239 (12. März 1990): 145–54.
121. Robinson, Simon D., Christian Janssen, Eric B. Fretz, Brian Berry, Alex J. Chase, Anthony Della Siega, Ronald G. Carere, u. a. „Red Blood Cell Storage Duration and Mortality in Patients Undergoing Percutaneous Coronary Intervention“. *American Heart Journal* 159, Nr. 5 (Mai 2010): 876–81. <https://doi.org/10.1016/j.ahj.2010.02.018>.
122. Romero-Gallo, Judith, Elif G. Sozmen, Anna Chytil, William E. Russell, Robert Whitehead, W. Tony Parks, Matthew S. Holdren, et al. "Inactivation of TGF-Beta Signaling in Hepatocytes Results in an Increased Proliferative Response after Partial Hepatectomy." *Oncogene* 24, no. 18 (April 21, 2005): 3028–41. doi:10.1038/sj.onc.1208475.
123. Russell, W. E., R. J. Coffey, A. J. Ouellette, und H. L. Moses. „Type Beta Transforming Growth Factor Reversibly Inhibits the Early Proliferative Response to Partial Hepatectomy in the Rat“. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85, Nr. 14 (Juli 1988): 5126–30.
124. Schmidt, Robert F., Florian Lang, and Schmidt-Lang, eds. *Physiologie des Menschen: mit Pathophysiologie ; [+ IMPP-Fragen Physiologie online]*. 30., neu bearb. und aktualisierte Aufl. Springer-Lehrbuch. Heidelberg: Springer Medizin, 2007.
125. Schödel, Johannes, Spyros Oikonomopoulos, Jiannis Ragoussis, Christopher W. Pugh, Peter J. Ratcliffe, and David R. Mole. "High-Resolution Genome-Wide

Mapping of HIF-Binding Sites by ChIP-Seq." *Blood* 117, no. 23 (June 9, 2011): e207-217. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-10-314427>.

126. Schofield, Christopher J., und Peter J. Ratcliffe. „Oxygen Sensing by HIF Hydroxylases". *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 5, Nr. 5 (Mai 2004): 343–54. <https://doi.org/10.1038/nrm1366>.

127. Semenza, G. L., B. H. Jiang, S. W. Leung, R. Passantino, J. P. Concordet, P. Maire, and A. Giallongo. "Hypoxia Response Elements in the Aldolase A, Enolase 1, and Lactate Dehydrogenase A Gene Promoters Contain Essential Binding Sites for Hypoxia-Inducible Factor 1." *The Journal of Biological Chemistry* 271, no. 51 (December 20, 1996): 32529–37.

128. Semenza, G. L. "Vascular Responses to Hypoxia and Ischemia." *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 30, no. 4 (April 1, 2010): 648–52. doi:10.1161/ATVBAHA.108.181644.

129. Shah, Akshay, Stuart McKechnie, Susan J. Brunskill, und Simon J. Stanworth. „Fresh versus Old Red Cell Transfusions: What Have the Recent Clinical Trials Found?" *Current Opinion in Hematology* 23, Nr. 6 (November 2016): 550–56. <https://doi.org/10.1097/MOH.000000000000283>.

130. Silliman, Christopher C., Ernest E. Moore, Marguerite R. Kelher, Samina Y. Khan, Lauren Gellar, und David J. Elzi. „Identification of Lipids That Accumulate during the Routine Storage of Prestorage Leukoreduced Red Blood Cells and Cause Acute Lung Injury". *Transfusion* 51, Nr. 12 (Dezember 2011): 2549–54. <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2011.03186.x>.

131. Simon, Marie-Pierre, Roselyne Tournaire, and Jacques Pouyssegur. "The Angiopoietin-2 Gene of Endothelial Cells Is up-Regulated in Hypoxia by a HIF Binding Site Located in Its First Intron and by the Central Factors GATA-2 and Ets-1." *Journal of Cellular Physiology* 217, no. 3 (December 2008): 809–18. doi:10.1002/jcp.21558.

132. Sims, J. E., M. A. Gayle, J. L. Slack, M. R. Alderson, T. A. Bird, J. G. Giri, F. Colotta, F. Re, A. Mantovani, and K. Shanebeck. "Interleukin 1 Signaling Occurs Exclusively via the Type I Receptor." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, no. 13 (July 1, 1993): 6155–59.

133. Solves, Pilar, Nelly Carpio, Federico Moscardo, Aima Lancharro, Isabel Cano, Angel Moya, Rafael Lopez-Andujar, and Miguel Angel Sanz. "Transfusion Management and Immunohematologic Complications in Liver Transplantation: Experience of a Single Institution." *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, December 22, 2014, 8–14. doi:10.1159/000370260.

134. Stephens, J. M., B. Z. Carter, P. H. Pekala, and J. S. Malter. "Tumor Necrosis Factor Alpha-Induced Glucose Transporter (GLUT-1) mRNA Stabilization in 3T3-L1

Preadipocytes. Regulation by the Adenosine-Uridine Binding Factor." *The Journal of Biological Chemistry* 267, no. 12 (April 25, 1992): 8336–41.

135. Stryer, Lubert, Brigitte Pfeiffer, and Johannes Guglielmi. *Biochemie*. 2., korr. Nachdruck 1994 der völlig Neubearb. Aufl. 1990. Heidelberg: Spektrum Akad. Verl, 1994.

136. Suri, C., P. F. Jones, S. Patan, S. Bartunkova, P. C. Maisonpierre, S. Davis, T. N. Sato, and G. D. Yancopoulos. "Requisite Role of Angiopoietin-1, a Ligand for the TIE2 Receptor, during Embryonic Angiogenesis." *Cell* 87, no. 7 (December 27, 1996): 1171–80.

137. Taguchi, K., and Y. Takagi. "[Aldolase]." *Rinsho Byori. The Japanese Journal of Clinical Pathology* Suppl 116 (November 2001): 117–24.

138. Tajima, Toshihide, Nobuhito Goda, Natsuko Fujiki, Takako Hishiki, Yasumasa Nishiyama, Nanami Senoo-Matsuda, Motohide Shimazu, et al. "HIF-1alpha Is Necessary to Support Gluconeogenesis during Liver Regeneration." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 387, no. 4 (October 2, 2009): 789–94. doi:10.1016/j.bbrc.2009.07.115.

139. Tal, M., D. L. Schneider, B. Thorens, and H. F. Lodish. "Restricted Expression of the Erythroid/brain Glucose Transporter Isoform to Perivenous Hepatocytes in Rats. Modulation by Glucose." *The Journal of Clinical Investigation* 86, no. 3 (September 1990): 986–92. doi:10.1172/JC1114801.

140. Tanaka, Toshio, Masashi Narazaki, und Tadamitsu Kishimoto. „IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease“. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 6, Nr. 10 (4. September 2014): a016295. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016295>.

141. Tsuchiya, S., M. Yamabe, Y. Yamaguchi, Y. Kobayashi, T. Konno, and K. Tada. "Establishment and Characterization of a Human Acute Monocytic Leukemia Cell Line (THP-1)." *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer* 26, no. 2 (August 1980): 171–76.

142. Thermo Scientific, 2010. *T042-TECHNICAL BULLETIN NanoDrop Spectrophotometers, 260/280 and 260/230 Ratios*. <http://www.nanodrop.com/Library/T042-NanoDrop-Spectrophotometers-Nucleic-Acid-Purity-Ratios.pdf>, Stand: Dezember 2015

143. Thomas, Markus, and Hellmut G. Augustin. "The Role of the Angiopoietins in Vascular Morphogenesis." *Angiogenesis* 12, no. 2 (June 2009): 125–37. doi:10.1007/s10456-009-9147-3.

144. Thurston, G., and C. Daly. "The Complex Role of Angiopoietin-2 in the Angiopoietin-Tie Signaling Pathway." *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2, no. 9 (September 1, 2012): a006650–a006650. doi:10.1101/cshperspect.a006650.

145. Uldry, Marc, and Bernard Thorens. "The SLC2 Family of Facilitated

Hexose and Polyol Transporters." *Pfluegers Archiv European Journal of Physiology* 447, no. 5 (February 1, 2004): 480–89. doi:10.1007/s00424-003-1085-0.

146. Unger, Ronald E., Vera Krump-Konvalinkova, Kirsten Peters, and C. James Kirkpatrick. "In Vitro Expression of the Endothelial Phenotype: Comparative Study of Primary Isolated Cells and Cell Lines, Including the Novel Cell Line HPMEC-ST1.6R." *Microvascular Research* 64, no. 3 (November 2002): 384–97. doi:10.1006/mvre.2002.2434.

147. Van de Stolpe, A., and P. T. van der Saag. "Intercellular Adhesion Molecule-1." *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)* 74, no. 1 (January 1996): 13–33.

148. Van de Watering, Leo M.G. and Anneke Brand. "Effects of Storage of Red Cells." *Transfusion Medicine and Hemotherapy* 35, no. 5 (2008): 359–67. doi:10.1159/000155221.

149. van Patot, Martha C., und Max Gassmann. „Hypoxia: Adapting to High Altitude by Mutating *EPAS-1* , the Gene Encoding HIF-2 α “. *High Altitude Medicine & Biology* 12, Nr. 2 (Juni 2011): 157–67. <https://doi.org/10.1089/ham.2010.1099>.

150. Vincent, K. A., K.-G. Shyu, Y. Luo, M. Magner, R. A. Tio, C. Jiang, M. A. Goldberg, G. Y. Akita, R. J. Gregory, and J. M. Isner. "Angiogenesis Is Induced in a Rabbit Model of Hindlimb Ischemia by Naked DNA Encoding an HIF-1 /VP16 Hybrid Transcription Factor." *Circulation* 102, no. 18 (October 31, 2000): 2255–61. doi:10.1161/01.CIR.102.18.2255.

151. Wang, G. L., and G. L. Semenza. "Purification and Characterization of Hypoxia-Inducible Factor 1." *The Journal of Biological Chemistry* 270, no.3 (January 20, 1995): 1230–37.

144. Weber, Axel, Peter Wasiliew, and Michael Kracht. "Interleukin-1 (IL-1) Pathway." *Science Signaling* 3, no. 105 (January 19, 2010): cm1. <https://doi.org/10.1126/scisignal.3105cm1>.

145. Winning, S., F. Splettstoesser, J. Fandrey, and S. Frede. "Acute Hypoxia Induces HIF-Independent Monocyte Adhesion to Endothelial Cells through Increased Intercellular Adhesion Molecule-1 Expression: The Role of Hypoxic Inhibition of Prolyl Hydroxylase Activity for the Induction of NF- κ B." *The Journal of Immunology* 185, no. 3 (August 1, 2010): 1786–93. doi:10.4049/jimmunol.0903244

146. Wojtowicz, J Martin, und Nohjin Kee. „BrdU assay for neurogenesis in rodents“. *Nature Protocols* 1, Nr. 3 (November 2006): 1399–1405. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.224>.

147. Yap, Cheng-Hon, Lawrence Lau, Mayur Krishnaswamy, Mary Gaskell, und Michael Yii. „Age of Transfused Red Cells and Early Outcomes after Cardiac Surgery“. *The Annals of Thoracic Surgery* 86, Nr. 2 (August 2008): 554–59. <https://doi.org/10.1016/j.athoracsur.2008.04.040>.
148. Ylä-Herttuala, Seppo, Tuomas T. Rissanen, Ismo Vajanto, und Juha Hartikainen. „Vascular Endothelial Growth Factors: Biology and Current Status of Clinical Applications in Cardiovascular Medicine“. *Journal of the American College of Cardiology* 49, Nr. 10 (13. März 2007): 1015–26. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2006.09.053>.
149. Yuan, H. T., E. V. Khankin, S. A. Karumanchi, and S. M. Parikh. “Angiopoietin 2 Is a Partial Agonist/Antagonist of Tie2 Signaling in the Endothelium.” *Molecular and Cellular Biology* 29, no. 8 (April 15, 2009): 2011–22. doi:10.1128/MCB.01472-08.
150. Zubair, Abba C., “Clinical Impact of Blood Storage Lesions”, *American Journal of Hematology* 85, Nr.2 (Februar 2010): 117-22 <https://doi.org/10.1002/ajh.2159>

6. Abbildungsverzeichnis

Abb.2. 1 HepG2 Zellen in Zellkultur	32
Abb.2. 2 THP-1 Zellen in Zellkultur	33
Abb.2. 3 HPMEC-ST1.6R in Zellkultur	34
Abb.2. 4 Absorptionskurve RNA.....	39
Abb.2. 5 Amplifikationskurve der q-PCR.....	43
Abb.3. 1 Proliferation von Hepatozyten nach partieller Hepatektomie, partieller Hepatektomie mit zusätzlich herbeigeführtem Blutverlust und partieller Hepatektomie mit zusätzlich herbeigeführtem Blutverlust und Ausgleich durch frische oder alte EKs.....	52
Abb.3. 2 Nachweis hypoxischer Areale im Lebergewebe der Ratte nach partieller Hepatektomie, und Transfusion von frischen (fEK) oder alten (aEK) Erythrozytenkonzentraten.....	55
Abb.3. 3 Induktion der Expression von HIF-1a und HIF-2a mRNA im Lebergewebe von Ratten nach PHx und re-transfusion von frischen (fEK) oder alten Erythrozyten (aEK).....	57
Abb.3. 4 Induktion der Expression von PGK1 und Aldolase mRNA im Lebergewebe von Ratten nach PHx und Retransfusion von frischen (fEK) oder alten Erythrozyten (aEK).....	58
Abb.3. 5 Induktion der Expression von EPO und TGF- β mRNA im Lebergewebe von Ratten nach PHx und Retransfusion von frischen (fEK) oder alten Erythrozyten (aEK).....	60
Abb.3. 6 Makrophagen Präsenz im Lebergewebe nach PHx, Blutverlust und Transfusion von fEKs, aEKs oder HAES.....	63
Abb.3. 7 Optischer Nachweis der Zunahme von freiem Hämoglobin im Überstand von unterschiedlich lang gelagerten EKs.....	64
Abb.3. 8 optischer Unterschied von zwei EK Überständen des gleichen Alters.....	65
Abb.3. 9 Einfluss der Überstände unterschiedlich lang gelagerter EKs auf die Proliferation und Vitalität von HepG2 Zellen.....	67
Abb.3. 10 Beeinflussung der α -1 α Expression in HepG2 Zellen nach Inkubation mit EKs unterschiedlichen Alters unter normoxischen Bedingungen (Nx).....	69
Abb.3. 11 Beeinflussung der HIF-1 α Expression in HepG2 Zellen nach Inkubation mit EKs unterschiedlichen Alters unter hypoxischen Bedingungen (Hx).....	70
Abb.3. 12 Beeinflussung der GLUT-1 Expression in HepG2 Zellen nach Inkubation mit EKs unterschiedlichen Alters unter normoxischen Bedingungen (Nx).....	71
Abb.3. 13 Beeinflussung der GLUT-1 Expression in HepG2 Zellen nach Inkubation mit EKs unterschiedlichen Alters unter hypoxischen Bedingungen (Hx).....	72
Abb.3. 14 Beeinflussung der EPO Expression in HepG2 Zellen nach Inkubation mit EKs unterschiedlichen Alters unter normoxischen Bedingungen (Nx).....	73
Abb.3. 15 Beeinflussung der VEGF Expression in HPME Zellen nach Inkubation mit EKs unterschiedlichen Alters unter normoxischen Bedingungen (Nx).....	75
Abb.3. 16 Beeinflussung der VEGF Expression in HPME Zellen nach Inkubation mit EKs unterschiedlichen Alters unter hypoxischen Bedingungen (Hx).....	76
Abb.3. 17 Beeinflussung der IL-1 β Expression in HPME Zellen nach Inkubation mit EKs unterschiedlichen Alters unter normoxischen (Nx) und hypoxischen Bedingungen (Hx).....	78
Abb.3. 18 Beeinflussung der IL-8 Expression in HepG2 Zellen nach Inkubation mit EKs unterschiedlichen Alters.....	79

Abb.3. 19 Beeinflussung der IL-8 Expression in HPME Zellen nach Inkubation mit EKs unterschiedlichen Alters unter normoxischen Bedingungen (Nx).....	80
Abb.3. 20 Beeinflussung der IL-8 Expression in HPME Zellen nach Inkubation mit EKs unterschiedlichen Alters unter hypoxischen Bedingungen (Hx).....	81
Abb.3. 21 Beeinflussung der ANG-2 Expression in HPME Zellen nach Inkubation mit EKs unterschiedlichen Alters unter normoxischen Bedingungen (Nx).....	82
Abb.3. 22 Beeinflussung der ICAM-1 Expression in HPME Zellen nach Inkubation mit EKÜs unterschiedlichen Alters unter normoxischen Bedingungen (Nx).....	83
Abb.3. 23 Beeinflussung der ICAM-1 Expression in HPME Zellen nach Inkubation mit EKs unterschiedlichen Alters unter hypoxischen Bedingungen (Hx).....	84
Abb.3. 24 Immunoblot zur Detektion von HIF-1 α in HepG2 Zellen nach Inkubation mit Überstand von 2d alten EKs unter (A) normoxischen und (B) hypoxischen Bedingungen.....	86
Abb.3. 25 Immunoblot zur Detektion von HIF-1 α in HepG2 Zellen nach Inkubation mit Überstand von 21d alten EKs unter (A) normoxischen und (B) hypoxischen Bedingungen...	86
Abb.3. 26 Immunoblot zur Detektion von HIF-1 α in HepG2 Zellen nach Inkubation mit Überstand von 42d alten EKs unter (A) normoxischen und (B) hypoxischen Bedingungen...	86
Abb.3. 27 Quantitative HIF-1 α Bestimmung in HepG2 Zellen nach Inkubation mit unterschiedlich alter EKÜs unter normoxischen Bedingungen.....	88
Abb.3. 28 Quantitative HIF-1 α Bestimmung in HepG2 Zellen nach Inkubation mit unterschiedlich alter EKÜs unter hypoxischen Bedingungen.....	89
Abb.3. 29 Zytokin Gehalt von 2, 21 und 42 Tagen lang gelagerter EKs des Spenders 12....	91
Abb.3. 30 CRP Konzentration in Überständen unterschiedlich lang gelagerter EKs.....	92
 Abb. 4. 1 Schematische Darstellung der <i>storage lesions</i> auf die Vitalität und Proliferation von Lebergewebe nach PHx.....	95
 Abb. 8. 1 Beeinflussung der HIF-1 α Expression in THP-1 Zellen nach Inkubation mit EKs unterschiedlichen Alters.....	123
Abb. 8. 2 Beeinflussung der VEGF Expression in THP-1 Zellen nach Inkubation mit EKs unterschiedlichen Alters.	124

7. Abkürzungsverzeichnis

aEK	alte Erythrozytenkonzentrate
ANG	Angiopoietin
ATP	Adenosintriphosphat
2,3-DPG	2,3-Diphosphoglycerat
BCA	Bicinchoninacid
BFU-E	Burst Forming Units-Erythroid
Brd-U	Bromodeoxyuridine
BSA	Bovines Serum Albumin
°C	Grad Celsius
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	complementary Deoxyribonucleic Acid
CFU-E	Colony Forming Units- Erythroid
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COX	Cyclooxygenase
CRP	C-reaktives Protein
Ct	Crossing threshold
DHAP	Dihydroxyacetonphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMOG	Dimethyloxalylglycin
DNA	Deoxyribonucleic Acid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal Growth Factor
EK	Erythrozytenkonzentrat
ELISA	Enzym Linked Immunosorbent Assay
EPO	Erythropoietin
EpoR	Epo-Rezeptor

Fe ²⁺	zweiwertiges Eisen
fEK	frische Erythrozytenkonzentrate
FIH	Factor Inhibiting HIF-1
fMRI	funktionelle Magnetresonanztomographie
GADP	Glycerinaldehyd-3-phosphat
GLUT	Glukosetransporter
Hb	Hämoglobin
HE	Hämotoxylin Eosin
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HIF	Hypoxie induzierter Faktor
HKG	House Keeping Gene
HPMEC	Human Pulmonary Microvascular Endothelial Cells
Hx	hypoxisch
IL	Interleukin
IL-R	Interleukin-Rezeptor
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule
i.o.	intraoperativ
i.p.	intraperitoneal
JAK-2	Januskinase-2
K ⁺	Kalium
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
kPa	Kilopascal
LFA	Leucocyte Function Associated Molecule
MAC-1	Makrophage-1 Antigen
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

µm	Mikrometer
mg	Milligramm
ml	Milliliter
Na ⁺	Natrium
NFκB	Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
ng	Nanogramm
NO	Stickstoff Monoxid
NTB	non transferrin bound
Nx	normoxisch
O ₂	Sauerstoff
OD	optische Dichte
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
pg	Picogramm
PGK	Phosphoglyceratkinase
PHD	Prolinhydroxylasen
PHx	partielle Hepatektomie
PIM	Pimonidazol
PO ₂	Sauerstoffpartialdruck
POT	Postoperativer Tag
PS	Phosphatidyserine
q-PCR	Quantitative PCR
RBC	Red Blood Cell
RNA	Ribonucleic Acid
RT	Reverse Transkription
sec.	Sekunden

STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
TGF	Transforming Growth Factor
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha
TRALI	Transfusion-Related-Lung-Injury
VEGF	Vascular Endothelial Growthfactor

8. Anhang

8.1. Abbildungen

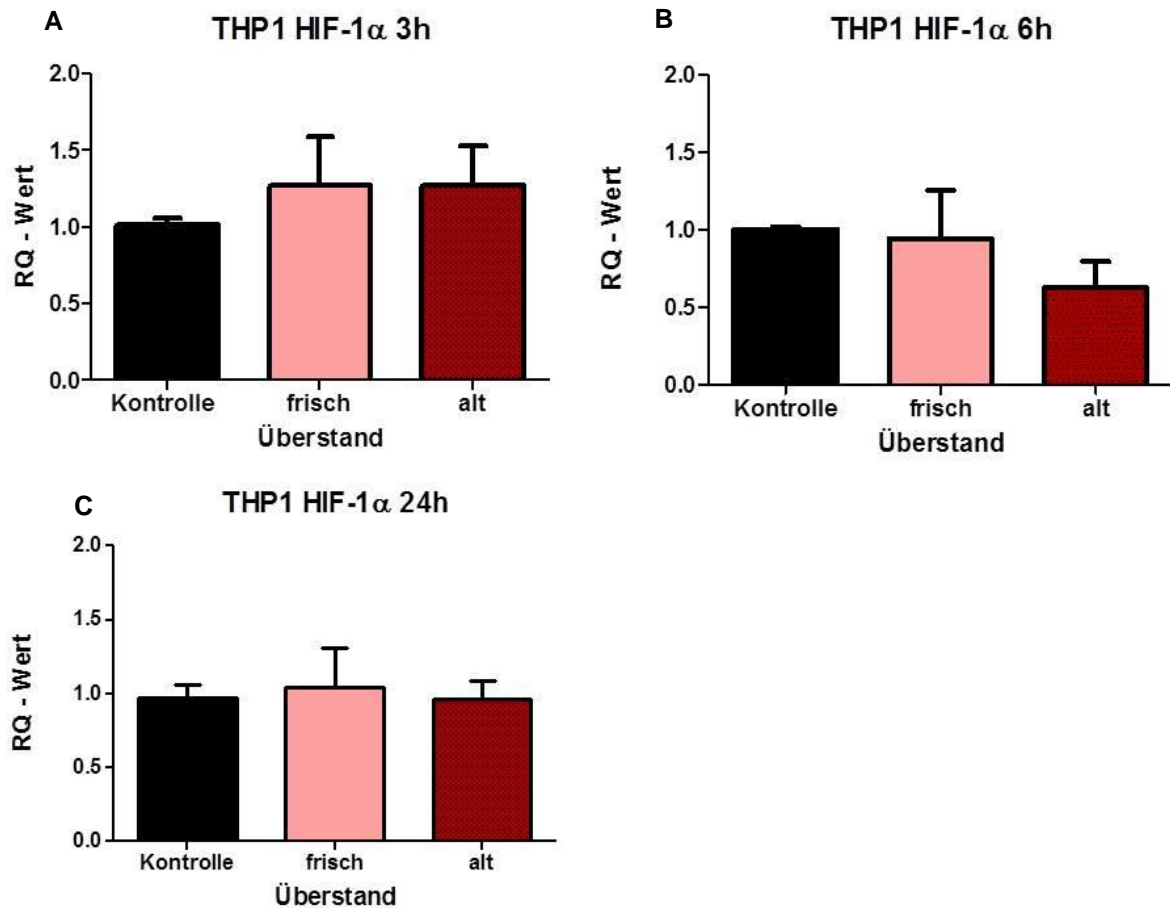


Abb. 8. 1 Beeinflussung der HIF-1α Expression in THP-1 Zellen nach Inkubation mit EKs unterschiedlichen Alters.

THP1 Zellen wurden für 3,6 bzw.24 Stunden mit den jeweiligen EK Überständen bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde mittels q-PCR die HIF-1α Expression bestimmt.

Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichung, n=6 (1-way ANOVA; Post Test: Dunnet's Test)

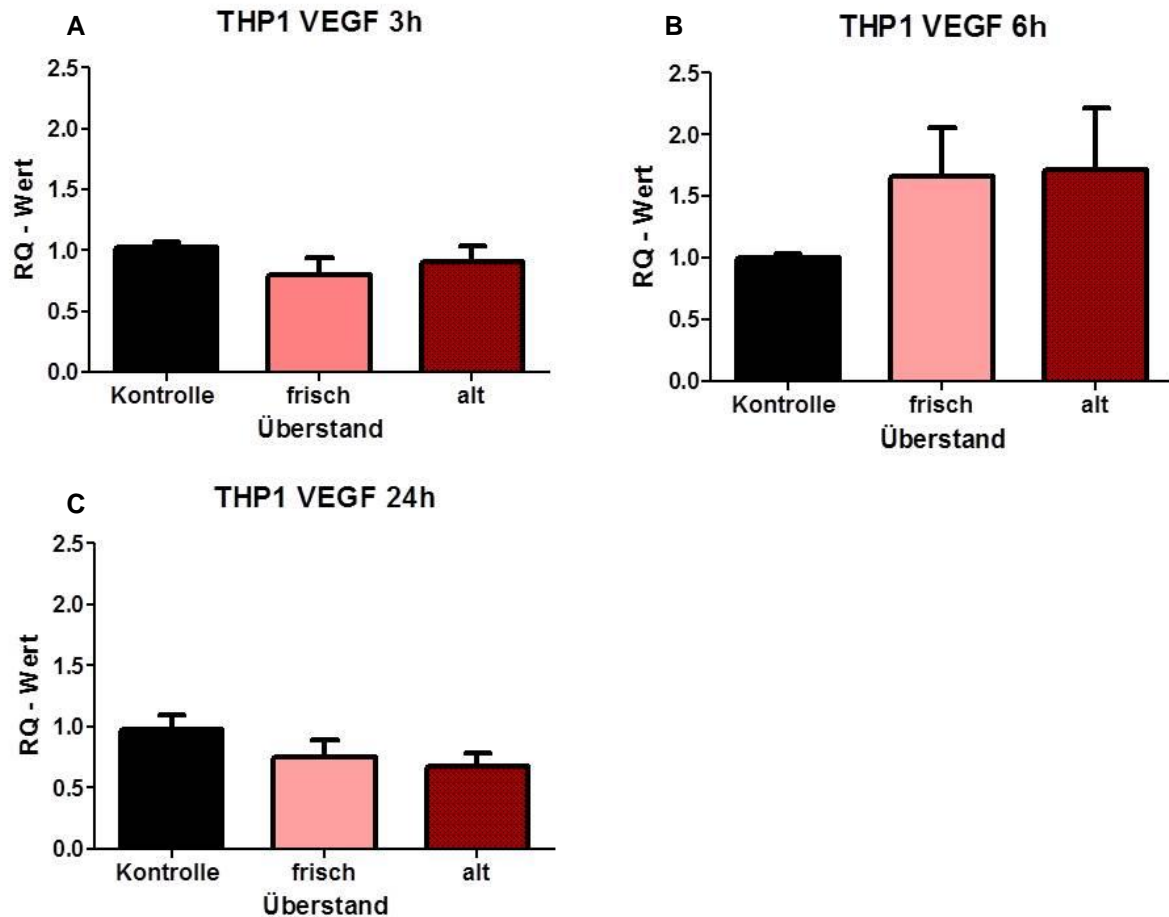


Abb. 8. 2 Beeinflussung der VEGF Expression in THP-1 Zellen nach Inkubation mit EKs unterschiedlichen Alters.

THP1 Zellen wurden für 3,6 bzw.24 Stunden mit den jeweiligen EK Überständen bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde mittels q-PCR die VEGF Expression bestimmt.

Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichung, n=6 (1-way ANOVA; Post Test: Dunnet's Test)

8.2. Tabellen

Tabelle 8.1. Nachweisbare Proteine und deren Lokalisation auf der Membran des Proteom Profiler™ Human XL Cytokin Array Kits

Koordinate	Analyt/Kontrolle	Entrez Gene ID	Alternativname
A1, A2	Reference Spots	N/A	RS
A3, A4	Adiponectin	9370	Acrp30
A5, A6	Aggrecan	176	Aggrecan 1
A7, A8	Angiogenin	283	
A9, A10	Angiopoietin-1	284	Ang-1, ANGPT1
A11, A12	Angiopoietin-2	285	ANG-2, ANGPT2
A13, A14	BAFF	10673	BLyS, TNFSF13B
A15, A16	BDNF	627	Brain-derived Neurotrophic Factor
A17, A18	Complement Component C5/C5a	727	C5/C5a
A19, A20	CD14	929	
A21, A22	CD30	943	TNFRSF8
A23, A24	Reference Spots	N/A	RS
B3, B4	CD40 ligand	959	CD40L, TNFSF5, CD154, TRAP
B5, B6	Chitinase 3-like 1	1116	CHI3L1, YKL-40
B7, B8	Complement Factor D	1675	Adipsin, CFD
B9, B10	C-Reactive Protein	1401	CRP
B11, B12	Cripto-1	6997	Teratocarcinoma-derived Growth Factor
B13, B14	Cystatin C	1471	CST3, ARMD11
B15, B16	Dkk-1	22943	Dickkopf-1
B17, B18	DPPIV	1803	CD26, DPP4, Dipeptidyl-peptidase IV
B19, B20	EGF	1950	Epidermal Growth Factor
B21, B22	EMMPRIN	682	CD147, Basigin
C3, C4	ENA-78	6374	CXCL5
C5, C6	Endoglin	2022	CD105, ENG
C7, C8	Fas Ligand	356	TNFSF6, CD178, CD95L
C9, C10	FGF basic	2247	FGF-2
C11, C12	FGF-7	2252	KGF
C13, C14	FGF-19	9965	
C15, C16	Flt-3 Ligand	2323	FLT3LG
C17, C18	G-CSF	1440	CSF3
C19, C20	GDF-15	9518	MIC-1
C21, C22	GM-CSF	1437	CSF2
D1, D2	GRO- α	2919	CXCL1, MSGA- α
D3, D4	Growth Hormone	2688	GH, Somatotropin

D5, D6	HGF	3082	Scatter Factor, SF
D7, D8	ICAM-1	3383	CD54
D9, D10	IFN- γ	3458	IFNG
D11, D12	IGFBP-2	3485	_____

Koordinate	Analyt/Kontrolle	Entrez Gene ID	Alternativname
D13, D14	IGFBP-3	3486	_____
D15, D16	IL-1 α	3552	IL-1F1
D17, D18	IL-1 β	3553	IL-1F2
D19, D20	IL-1ra	3557	IL-1F3
D21, D22	IL-2	3558	_____
D23, D24	IL-3	3562	_____
E1, E2	IL-4	3565	_____
E3, E4	IL-5	3567	_____
E5, E6	IL-6	3569	_____
E7, E8	IL-8	3576	CXCL8
E9, E10	IL-10	3586	_____
E11, E12	IL-11	3589	_____
E13, E14	IL-12p70	3593	_____
E15, E16	IL-13	3596	_____
E17, E18	IL-15	3600	_____
E19, E20	IL-16	3603	_____
E21, E22	IL-17A	3605	IL-17, CTLA8
E23, E24	IL-18 BP α	10068	_____
F1, F2	IL-19	29949	_____
F3, F4	IL-22	50616	IL-TIF
F5, F6	IL-23	51561	IL-23A, SGRF
F7, F8	IL-24	3627	C49A, FISP, MDA-7, MOB-5, ST16
F9, F10	IL-27	246778	_____
F11, F12	IL-31	386653	_____
F13, F14	IL-32 $\alpha/\beta/\gamma$	9235	_____
F15, F16	IL-33	90865	C9orf26, DVS27, NF-HEV
F17, F18	IL-34	146433	C16orf77
F19, F20	IP-10	3627	CXCL10
F21, F22	I-TAC	6373	CXCL11, SCYB9B
F23, F24	Kallikrein 3	354	PSA, KLK3
G1, G2	Leptin	3952	OB
G3, G4	LIF	3976	_____
G5, G6	Lipocalin-2	3934	NGAL, LCN2, Siderocalin
G7, G8	MCP-1	6347	CCL2, MCAF

G9, G10	MCP-3	6354	CCL7, MARC
G11, G12	M-CSF	1435	CSF1
G13, G14	MIF	4282	_____
G15, G16	MIG	4283	CXCL9
Koordinate	Analyt/Kontrolle	Entrez Gene ID	Alternativname
G17, G18	MIP-1 α /MIP-1 β	6348/6351	CCL3/CCL4
G19, G20	MIP-3 α	6364	CCL20, Exodus-1, LARC
G21, G22	MIP-3 β	6363	CCL19, ELC
G23, G24	MMP-9	4318	CLG4B, Gelatinase B
H1, H2	Myeloperoxidase	4353	MPO, Lactoperoxidase
H3, H4	Osteopontin	6696	OPN
H5, H6	PDGF-AA	5154	_____
H7, H8	PDGF-AB/BB	5154/5155	_____
H9, H10	Pentraxin-3	5806	PTX3, TSG-14
H11, H12	PF4	5196	CXCL4
H13, H14	RAGE	177	_____
H15, H16	RANTES	6352	CCL5
H17, H18	RBP4	5950	_____
H19, H20	Relaxin-2	6019	RLN2, RLXH2
H21, H22	Resistin	56729	ADSF, FIZZ3, RETN
H23, H24	SDF-1 α	6387	CXCL12, PBSF
I1, I2	Serpin E1	5054	PAI-I, PAI-1, Nexin
I3, I4	SHBG	6462	ABP
I5, I6	ST2	9173	IL-1 R4, IL1RL1, ST2L
I7, I8	TARC	6361	CCL17
I9, I10	TFF3	7033	ITF, TFI
I11, I12	TfR	7037	CD71, TFR1, TFRC, TRFR
I13, I14	TGF- α	7039	TGFA
I15, I16	Thrombospondin-1	7057	THBS1, TSP-1
I17, I18	TNF-alpha	7124	TNFSF1A
I19, I20	uPAR	5329	PLAUR
I21, I22	VEGF	7422	BEGFA
J1, J2	Reference Spots	N/A	RS
J5, J6	Vitamin DBP	2638	VDB, DBP, VDBP
J23, J24	Negative Controls	N/A	Control (-)

aus: Datenblatt Proteome Profiler Zytokine Human XL Cytokine Array Kit, Firma R&B Systems, 2014.

<https://resources.rndsystems.com/pdfs/datasheets/ary022>.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Frau PD Dr. rer. nat. Stilla Frede bedanken. Sie hat mir das interessante Thema zur Verfügung gestellt, mich während jeder Phase meiner Dissertation exzellent betreut und ist eine außergewöhnlich tolle Chefin, fachlich wie menschlich. Herzlichen Dank dafür!

Als nächstes danke ich Prof. Prof. h.c. Dr. med. vet. Max Gassmann für die Annahme der Doktorarbeit und vor allem für die Geduld!

Weiter möchte ich mich beim ganzen Team des Forschungslabors der Anästhesie der Uniklinik Bonn bedanken.

Allen voran vielen Dank an Susanne Schulz für die exzellente Einarbeitung in die allgemeine Laborarbeit, die Genexpressionsanalyse, die Durchführung von ELISAs und natürlich für die tiefe Freundschaft, die sich während unserer Zusammenarbeit entwickelt hat.

Vielen Dank an Frank Splettstoesser für die Einarbeitung und stetige Unterstützung während der Anfertigungen der Western Blots, lieben Dank an Alexandra Casalter für die lehrreiche Einweisung in das Arbeiten mit Zellkulturen und vielen Dank an Jan Kleinert und Mario Fox für die durchgehend geduldige und hilfreiche Beantwortung allgemeiner Laborfragen.

Es macht sehr viel Spaß in einem so lustigen und herzlichen Team zu arbeiten - dafür an Euch alle ein großes Dankeschön!

Meinen Eltern und meinem Bruder gilt ein sehr großer Dank für die Unterstützung, die Hilfe und den Halt, den Ihr mir in wirklich allen Lebenslagen gegeben habt und zu jeder Zeit gebt!

Natürlich möchte ich mich ganz herzlich bei meinem Ehemann Alexander bedanken! Für sein Verständnis, seine Unterstützung und seine Geduld mit mir. Ohne Dich wäre so vieles nicht möglich gewesen, Du bist einmalig - Danke!

Und letztendlich an meinen Sohn Maximilian: Danke, dass Du da und einfach wundervoll bist!!

Curriculum Vitae

Vorname Name	Katrin Stein
Geburtsname	Schroeder
Geburtsdatum	25.November 1983
Geburtsort	Bonn, Deutschland
Nationalität	Deutsch
09/1990 – 07/1994	Grundschule in Bonn, Deutschland
09/1994 – 07/2003	Ernst-Moritz-Arndt Gymnasium Bonn, Deutschland
26/06/2003	Abitur, allgemeine Hochschulreife, Ernst-Moritz-Arndt Gymnasium Bonn, Deutschland
10/2003 - 9/2005	Studium der Gesundheitsökonomie, Universität zu Köln, Deutschland
10/2005 – 11/2011	Studium der Veterinärmedizin, Veterinärmedizinische Universität Wien, Österreich
05/11/2011	Diplom-Tierärztin, Universität Wien, Österreich
03/2012 – 12/2019	Anfertigung der Dissertation unter Leitung von Prof. Prof. h.c. Dr.med.vet. Max Gassmann am Institut für Veterinärphysiologie der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich Direktor Prof. Prof. h.c. Dr. med. vet. Max Gassmann

- 12/2011 – 02/2012 Assistenztierärztin in der Tierarztpraxis Dr.C.Schütte,
Bonn, Deutschland
- 10/2012 – 10/2017 Assistenztierärztin in der Tierarztpraxis H.Hoffmann, Bad
Honnef, Deutschland
- Seit 11/2017 Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Forschungslabor der
Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und operative
Intensivmedizin, Universitätsklinikum Bonn, Deutschland
- Publikation
- 12/2017 Matot I., Nachmansson N., Duev O., Schulz S., **Schroder-
Stein K.**; Frede S., Abramovitch R. *Impaired liver
regeneration after hepatectomy and bleeding is associated
with a shift from hepatocyte proliferation to hypertrophy.*
FASEB J. 2017 Dec;31(12):5283-5295.
doi: 10.1096/fj.201700153R